

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

**Un composite nuevo de fosfato cálcico-silicato cálcico para la
regeneración ósea: caracterización y comportamiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julia Lucas Aparicio

Directores

Luis Blanco Jerez
Enrique López Cabarcos
Mohammad Hamdan Ali Alkhraisat

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL
ESTOMATOLOGÍA III



TESIS DOCTORAL

UN COMPOSITE NUEVO DE FOSFATO CÁLCICO-SILICATO
CÁLCICO PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA:
CARACTERIZACIÓN Y COMPORTAMIENTO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR:

JULIA LUCAS APARICIO

Bajo la dirección de los doctores:

Prof. Luis Blanco Jerez

Prof. Enrique López Cabarcos

Dr. Mohammad Hamdan Ali Alkhraisat

Madrid, 2013

*Con mucho cariño a toda mi familia,
especialmente a mis padres Tomás y Concha
y a mi hermana Celia, por apoyarme día a día.*

AGRADECIMIENTOS

Mis primeras palabras quiero que vayan dirigidas a mis tres directores de tesis, a los que les agradezco especialmente la oportunidad que me han brindado al trabajar bajo su dirección, y por el apoyo recibido durante la realización de esta tesis:

Al Dr. Luis Blanco Jerez por sus valiosos consejos y lucha en el campo de la investigación.

Al Dr. Enrique López Cabarcos por su constante estímulo científico y su gran capacidad para dirigir a un grupo tan heterogéneo (físicos, químicos, farmacéuticos y odontólogos) y saber lo mejor que podemos aportar cada uno.

Al Dr. Mohamad Alkhraisat por introducirme y darme mis primeros conocimientos en el mundo de los cementos cálcicos y guiarme a lo largo de esta tesis.

También quiero dirigir unas palabras, con especial cariño, a la Dra. Carmen Rueda “Monte” por ayudarme en todo momento en mis múltiples dudas y aportar todo su conocimiento día a día. No solo dio toda su ayuda profesional si no también su amistad.

A la Dra. Jatsue Cabrejos Azama, por todos estos años en los que hemos compartido metas profesionales a través de las cuales hemos desarrollando una gran amistad.

A todas las personas que componen el departamento de Físico-química II de la Facultad de Farmacia por ser gente tan cercana, especialmente a las personas que componen el grupo de investigación Matnabio: Marco, Jorge, David, Paulino y Ángel con quienes he compartido muchos días de laboratorio.

Al Dr. Jesús Torres de la Facultad de Odontología de la (URJC) por su colaboración en las cirugías experimentales con conejos, su personalidad hizo mas fácil el trabajo.

A los doctores Andrea Eswald y Uwe Gbureck del Department of Funcional Materials in Medicine and Dentistry de la Universidad de Wurzburg por su colaboración en las pruebas *in vitro*.

Y por último a la Dra. Conchita Pintado del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia (UCM) por su colaboración en las pruebas de actividad antimicrobiana.

ÍNDICE

I.- ABSRACT.....	11
II.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	19
III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	25
IV.- OBJETIVOS.....	27
V.- GLOSARIO ABREVIATURAS	29
VI.- INTRODUCCIÓN.....	31
1. Tejido Óseo	32
1.1 Organización del tejido óseo	32
1.1.1. Componente celular	32
1.1.2. Matriz orgánica	35
1.1.3. Fase mineral	41
1.2 Tipos de tejido óseo	42
1.3 Propiedades mecánicas del tejido óseo.....	45
2. Osificación, remodelado y reparación ósea.....	45
2.1 Osificación.....	45
2.1.1 Tipos de osificación	45
2.2 Remodelado óseo.....	49
2.2.1 Fases del remodelado óseo.....	50
2.2.2. Fases de maduración del hueso.....	52
2.2.3. Factores reguladores del remodelado óseo	53
2.3 Reparación ósea	57
3. Estrategias actuales para la regeneración de tejidos óseos.....	60
3.1 Propiedades de los biomateriales.....	68
3.2 Clasificación de los biomateriales	70
3.2.1 Biomateriales cerámicos	71
3.2.2 Cementos de fosfato cálcico	76
3.2.2.1 Cemento de fosfato cálcico sustituidos con silicio	80

VII.- MATERIAL Y MÉTODO	85
1. Síntesis del material.....	86
2. Caracterización del material	88
2.1 Difracción de rayos X y análisis de Rietveld.....	88
2.2 Espectroscopía de infrarrojos	89
2.3 Microscopía electrónica de barrido	90
2.4 Determinación del tiempo de fraguado.....	91
2.5 Determinación de la fuerza de tensión diametral	92
2.6 Determinación de la porosidad	93
2.7 Análisis BET del área de superficie específica.....	93
2.8 Liberación de iones.....	94
3. Estudio <i>in vitro</i> de citocompatibilidad	95
3.1 Proliferación y actividad celular	95
3.2 Microscopía electrónica de barrido	97
4. Eficacia del cemento como matriz para la liberación controlada de medicamentos	98
4.1 Cinética de liberación del antibiótico	98
4.2 Estudio de actividad antimicrobiana del antibiótico incorporado al cemento.....	101
5. Estudio <i>in vivo</i> de regeneración ósea	102
VIII.- RESULTADOS DISCUSIÓN.....	109
1. Caracterización del material.....	110
1.1 Resultados de la caracterización del material.....	110
1.1.1 Difracción de rayos X y análisis de Rietveld.....	110
1.1.2. Espectroscopía de infrarrojos.....	114
1.1.3. Microscopía electrónica de barrido.....	115
1.1.4 Determinación del tiempo de fraguado.....	120
1.1.5 Determinación de la fuerza de tensión diametral.....	121
1.1.6 Determinación de la porosidad y análisis BET del área de superficie específica	121
1.1.7 Liberación de iones	125
1.2 Discusión de la caracterización del material	127

2. Estudio <i>in vitro</i> de citocompatibilidad	134
2.1 Resultados del estudio <i>in vitro</i> de citocompatibilidad.....	134
2.1.1 Proliferación y actividad celular	134
2.1.2 Microscopía electrónica de barrido.....	139
2.2 Discusión del estudio <i>in vitro</i> de citocompatibilidad	146
3. Eficacia del cemento como matriz para la liberación controlada de medicamentos	149
3.1 Resultados de la eficacia del cemento como matriz para la liberación controlada de medicamentos.....	149
3.1.1 Cinética de liberación del antibiótico	149
3.1.2 Estudio de la actividad antimicrobiana del antibiótico incorporado al cemento.....	163
3.2 Discusión de la eficacia del cemento como matriz para la liberación controlada de medicamentos controlada de medicamentos	168
4. Estudio <i>in vivo</i> de regeneración ósea	176
4.1 Resultados del estudio <i>in vivo</i> de regeneración ósea.....	176
4.1.1 Estudio histológico.....	177
4.1.2 Estudio histomorfométrico.....	189
4.2 Discusión del estudio <i>in vivo</i> de regeneración ósea.....	193
 IX.- DISCUSIÓN FINAL.....	199
X.- CONCLUSIONES.....	207
XI.- BIBLIOGRAFÍA.....	209
XII.- TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS	229

I.- ABSTRACT

1. **INTRODUCTION**

Regenerative medicine is advancing at rapid pace to offer efficient solutions to the loss of tissue substance with the main focus being on the regeneration of individual tissues such as bone, cartilage, skin and nerve. A new challenge for this therapeutic tool is the reconstructions of functional interfaces between tissues such as those existing between cartilage and bone, tendon and bone, or ligament and bone. A second challenge is to tailor the delivery of bioactive substances according to the needs of each patient. The structure and properties of most biomaterials employed for tissue engineering are isotropic; however, the proper regeneration of tissues and their interfaces many times requires materials with graded properties ^[1, 2]. The development of a system that employs the same synthetic pathway to generate biomaterials with properties that change gradually may constitute the basis to develop new gradient biomaterials for tissue engineering.

Calcium phosphate cements (CPCs) are biomaterials with excellent biocompatibility that have been studied as local-delivery systems of drugs, bone substitutes and bioactives. These biomaterials are produced through the reaction of a solid phase, usually calcium phosphate powders, with an aqueous solution. Among them, dicalcium phosphate dihydrate (brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) cements have become recent foci of research as they are osteotransductive, biocompatible and can serve as matrix for local drug delivery ^[3, 4, 5, 6]. There are two ways to improve the properties of CPCs (calcium phosphate cements): adding substances that promote bone regeneration such as hormones (RhGh) or doping the material with ions that stimulate physiological process. Silicon (Si) was an essential trace element for metabolic processes associated with the development of bone and connective tissues ^[7]. Silicon ions could produce changes in the properties of the CPC that improved in vitro and vivo performance.

2. **OBJECTIVES**

To prove the hypothesis that silicon ions improve the properties of CPCs we chose to modify the ceramic component of brushite cement as the single point to vary during the setting reaction of the cement. We synthesized the reactant β -tricalcium phosphate's with different amounts of silicon ions by substituting dicalcium phosphate dihydrate with fumed silica at varying molar ratios. We evaluate the effect of the addition of silicon in the CPC with regard to their physicochemical properties, and we

characterize the new material. Furthermore vancomycin was employed as model drug to figure out its release kinetics from the CPC. We incorporate the vancomycin into the CPC using two different methods, adsorption from a solution or as a powder mixed with the solid phase of the cement. We evaluate the ability of the CPC to release the antibiotic and its antimicrobial activity. The cytocompatibility of the new biomaterials was also tested using human like osteoblast cell line MG 63. Finally to evaluate the *in vivo* bone regeneration we use rabbit calvaria as animal model.

3. RESULTS

3.1. BIOMATERIAL CHARACTERIZATION

The analysis of the X-ray diffraction pattern of the synthesized ceramics showed that silicon ions induced the formation of a biphasic ceramic composed of calcium phosphate silicate (silicocarnotite; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) and β -tricalcium phosphate (β -TCP). The setting reaction using β -TCP, 20%Si-TCP, 40%Si-TCP and 80%Si-TCP has resulted in cement matrices of different Si (silicon) fractions. Undoped cement was mainly composed of brushite crystals while the Si-doped cements are characterized by the presence of crystalline and amorphous phases. The crystalline phases include brushite whose diffraction peaks are shifted toward lower diffraction angles when compared to un-doped brushite. Furthermore hydroxyapatite (HA), unreacted β -TCP, and unreacted silicocarnotite were also identified. The increase in Si content gave as result the appearance of an amorphous halo centred at about $2\theta=30^\circ$ indicative of the presence of an amorphous $\text{Ca}_x(\text{SiO}_4)_y$ phase. As the diffraction pattern of C-S-H gel is characterized by a halo at $2\theta=29.5^\circ$, this would suggest the formation of C-S-H within the matrix of Si-doped cements. The composition of the Si doped cements was also corroborated by means of FTIR. The presence of hydroxyapatite in the cement prepared with 40%Si-TCP is indicated by the vibration bands at 599, 628, 921 and 960 cm^{-1} whereas that of C-S-H is indicated by the bands at 844 and 944 cm^{-1} [14, 15]. Moreover, the band at 474 cm^{-1} could be assigned to P-O or Si-O bonds of hydroxyapatite and C-S-H, respectively. The vibration bands of PO_4^{3-} group of hydroxyapatite between $960\text{--}1096\text{ cm}^{-1}$ were absent from the FTIR spectra of 20% and 80% Si-cements. While the vibration bands of the SiO_4^{4-} group are present at 473, 844 and 943 cm^{-1} .

The SEM analysis of the cements matrix revealed a conspicuous change in the morphology of the crystals induced by the incorporation of SiO_4^{4-} ions. Thus, the undoped brushite cement is composed of platelet-like crystals of two main sizes: $2.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ and $1.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$. When the Si content increases, the population of rounded morphology increased at the expense of the population of plate-like morphology. Within the cement prepared with 80%Si-TCP it is possible to observe 3D tube-like structures. The average dimensions of these tube-like structures are $73 \pm 2 \mu\text{m}$ in length and $13.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in diameter, and they are composed of rounded nanocrystals of an average diameter of $160 \pm 20 \text{ nm}$.

Further cement characterization with high-pressure Hg porosimetry showed that the Si-doped cements have greater porosity than un-doped cements, 41% against 36%, respectively. The non doped cement has an average pore diameter of 135 nm. This diameter is sensitive to Si-doping, such that it is reduced from 1.725 μm , for 20% Si-cement, down to 48 and 37 nm, for 40% and 80% Si-cements respectively. Moreover, Si doping has a pronounced effect on cement's specific surface area (SSA) that increases from $3.39 \pm 0.01 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ for non doped cements up to 4.92 ± 0.02 , 5.8 ± 0.1 and $28.7 \pm 0.1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ for 20%, 40% and 80% Si-cements, respectively.

The setting reaction of the cements was significantly affected by the biphasic ceramics. Si-doping accelerates the cement setting reaction, as indicated by the decrease in the final setting time from 20 ± 1 minutes for un-doped cement to 2 ± 0.2 minutes for Si-doped cements. Meanwhile the diameter tensile strength was about $2 \pm 0.5 \text{ MPa}$ for all cements except for 80%Si cement that gave a value of $0.7 \pm 0.1 \text{ MPa}$.

3.2. BIOMATERIAL AS DRUG-RELEASE MATRIX

After characterization, we evaluate the ability of the cements for the local delivery of bioactives using vancomycin as model drug. Two grams of cement powder were mixed with 8.4 mg (low dose) and 100 mg (high-dose) of vancomycin, and subsequently the cement was prepared. The vancomycin release profiles from the cements prepared with different amounts of Si-TCP were measured, and we observed that the variation of the Si content together with the dose of the vancomycin permits to adapt the release profile to kinetics of different order. Thus, at low dose, the release of vancomycin from un-doped cement, 20%Si, and 40%Si-cements follows a diffusion

Abstract

mechanism and are characterized by an initial burst of between 90% and 60% of the loaded dose, after 24h of incubation. However, the cement prepared with 80% Si-TCP shows a zero-order release with a constant release rate of $0.29\% \text{ h}^{-1}$ for 10 days. The increase of vancomycin dose within the cement accelerates the changes in release kinetics toward the plateau region. The un-doped cement and the 20%Si cement completed the release of vancomycin after 48 h, whereas the 40%Si cement released 50% and 82% of the loaded dose after 24 and 240 h respectively. The cement prepared with 80%Si presents zero-order release kinetics up to 144 h after the beginning of the experiment. The change in the release kinetics seems to be related to the structural features of Si-doped cements since the increase in SSA (specific surface area) and the decrease in average pore diameter shifts the release kinetics from first order to zero order.

An alternative way to load the cements with a drug is to use the absorption of adding from a solution and thus, the release of the drug would be the corresponding desorption process. Due to small differences between undoped cement and 20% Si cement, this study was performed with undoped, 40% and 80% Si cements. The Si-doped cements show a higher affinity to vancomycin as stated by the higher amount of adsorbed drug which increases with the Si content. Furthermore, the differences between Si-doped matrices can be clearly appreciated as the drug concentration increases.

The desorption kinetics of vancomycin, from cylindrical cement samples, was determined for samples incubated at 5, 10, and 20 mg.mL^{-1} . The undoped samples, incubated in 5 mg.mL^{-1} , released almost 60% of the loaded dose after 13 h, and 80% of the loaded dose after 157 h. The cement prepared with 40%Si-TCP lowered the released fraction to 41% of the loaded dose. The release profile from these two cements agrees well with the Korsmeyer-Peppas model and the value $n < 0.54$ indicates that the process is diffusion controlled. This first order kinetic switched to zero order kinetic for 80%Si cement resulting in the release of 27% of the dose after 157 h at a rate of $0.14\%.\text{h}^{-1}$.

The cements incubation in a drug solution with a concentration of 10 mg.mL^{-1} increased the rate of vancomycin desorption up to 93%, 62% and 53% for undoped cements, 40% and 80%Si cements, respectively. Interestingly, the released profile of the 80%Si-TCP cement follows a zero order kinetic up to 100 h, and afterwards started to

Abstract

settle toward a constant release. The data fitting to Korsmeyer-Peppas model indicates a diffusion-controlled release for β -TCP and 40%Si-TCP cements, and anomalous transport for cements prepared with 80%Si-TCP ($n = 0.50$). The released fraction increases up to 97% for undoped cements and up to 62% for Si-doped cements incubated at 20 mg. mL⁻¹ of vancomycin. The drug desorption was diffusion controlled and follows first order kinetics for all cements.

A vital threshold for a local delivery system is the maintenance of the activity of the loaded bioactive. The antimicrobial activity of the released vancomycin was evidenced by the production of inhibition zone of *S. aureus* growth. This zone has a diameter of 31 mm around a cylindrical sample prepared with Si-doped cements, and 32 mm around undoped cements. The diameter around cements set with vancomycin was 34 mm for β -TCP and 20%Si-cements, and of 30 and 32 mm for 40%Si and 80%Si-cements respectively.

3.3. IN VITRO CYTOCOMPATIBILITY OF THE BIOMATERIAL

Additionally, the cytocompatibility test showed that the Si-doped cements promote the housing of MG 63 osteoblast like cells on its surface. In addition, the proliferation of osteoblast on the cements was enhanced by Si doping. Statistical analysis showed that both, cement type and culture time, affected significantly the cell proliferation that continuously grows till the seventh day of cell culture. Significant differences in cell proliferation were absent between undoped, 20%Si and 40%Si cements. However, the 80%Si cement significantly increased the cell proliferation (up to 2 folds) when compared to the other cements. Thus, these new biomaterials could be used efficiently as carriers and transporters of bone forming cells. The cellular activity increases up to the seventh day and was lowered for 20%Si and 40%Si-cements in comparison with undoped cements. However, in the 80%Si cement the osteoblasts activity was conspicuously enhanced.

3.4. IN VIVO HISTOLOGICAL AND HISTOMORPHOMETRIC EVALUATION

The silicon CPCs were used to fill critical bone defects in rabbit calvaria. The samples were harvested after 8 weeks of implantation for bone evaluation. In histological studies without the application of any graft it can be seen that the defect is not spontaneously regenerated, so this model is used as a negative control. CPCs

prepared with Si showed that the bone substitutes interact efficiently with the surrounding bone and induce the formation of bone tissue. Fibrous tissue was not identified in any of the samples. Furthermore, the cements with higher amounts of silicon present slower degradation of the biomaterial. The histomorphometric evaluation with ANOVA analysis revealed that the bone formation was significantly higher in 10% Si-CPC compared with cements without silicon. The remaining graft was significantly higher in 80% Si-CPC compared with cements without silicon, and in 40% Si-CPC compared with 10% Si-CPC.

4. CONCLUSIONS

We report a promising synthetic pathway to produce biomaterials with tuneable properties. A novel cement system was developed to produce a composite of brushite and C-S-H. This cement system employed as a reactant Si-substituted ceramic mainly composed of Si-substituted β -TCP and silicocarnotite. The cement matrix was a composite of crystalline phases (mainly brushite, HA and residual reactants) and amorphous component (C-S-H). The new biomaterial is characterized by a high surface area and nanometric pores. By controlling these parameters of composition and structure of the material through the amount of Si doping, it is possible to control the drug release, the release dose, and the selection of the order of the release kinetics. Conjointly, the new biomaterial provides a next to enhance osteoblasts growth and its proliferation that could be of interest in bone engineering. The *in vivo* results of CPCs prepared with Si showed that the bone substitutes interact efficiently with the surrounding bone and induce the formation of bone tissue. Furthermore, these cements present slower degradation rates, this property scale up with the increase in silicon content. An optimum *in vitro* and *in vivo* effect of Si may be laid in providing adequate Si concentration that affects bone metabolism through an equilibrated effect on the mechanism that control the cellular activity of bone-forming and bone-reabsorption cells.

II.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Antecedentes y justificación

El uso de implantes dentro de las distintas especialidades médicas ha experimentado un ascenso exponencial en la pasada década. Son cada vez más los pacientes que demandan o necesitan este tipo de tratamiento médico, dentro de los cuales se encuentran los implantes dentales, que componen uno de los tratamientos habituales en la práctica odontológica, siendo una opción de tratamiento para aquellos pacientes con edentulismo parcial o total. Para su colocación es imprescindible disponer de una cantidad óptima de hueso. Pero la longevidad de la población, cada vez mayor, ha propiciado que los tejidos y órganos degeneren y surja la necesidad de repararlos o reponerlos para poder ofrecer este tipo de tratamiento al paciente. Según la OMS, en el siglo XX se produjo una revolución de la longevidad. La esperanza media de vida ha aumentado 20 años desde 1950 situándose actualmente en los 66 años, y se prevé que para 2050 aumente 10 años más ^[8, 9].

El propósito principal a la hora de reparar un tejido es diseñar estructuras jerárquicas capaces de ser aceptadas por el receptor, restaurar la función dañada y reaccionar de manera controlada con el entorno biológico, a fin de estimular mecanismos específicos ^[10]. Hasta ahora la solución han sido los trasplantes alogénicos o autólogos. Estos sistemas tienen algunas limitaciones como la escasa disponibilidad de órganos y tejidos de donantes, el rechazo y el riesgo al que se somete el donante. Por ello, la solución ideal sería crear en el laboratorio órganos y tejidos sintéticos que funcionen como el natural, ante la necesidad de disponer de una cantidad ilimitada de órganos o tejidos óseos. El aumento de la esperanza de vida y la obligación de asegurar una cierta calidad de vida, han sido factores claves para el desarrollo de los biomateriales.

La regeneración ósea se ha intentado desde hace años utilizando biomateriales con proporciones de calcio y fósforo similares a las de la composición ósea, sin conseguir que estos biomateriales inicien y mantengan la formación de hueso con características físicas y funcionales como para sustituir al hueso natural. Es por ello, que para progresar en este campo, es condición indispensable conocer la fisiología de la formación ósea, los mecanismos implicados en su control, e investigar la interacción hueso-biomaterial a nivel macroscópico, celular y molecular.

Inicialmente, el interés se centró en cerámicas biológicamente inertes como la alúmina o la zirconia, debido a su resistencia a la corrosión, resistencia mecánica, y bajos coeficientes de fricción y desgaste. Las cerámicas bioactivas con proporciones de calcio y fósforo similares a las de la composición ósea, como son los fosfatos cálcicos, dentro de los cuales se encuentran la hidroxiapatita (HA) o el fosfato tricálcico β (β -TCP), se introdujeron como sustitutos óseos en los años setenta, debido a su buen comportamiento biológico, similar a la fase mineral del hueso, que es una HA carbonatada. Los fosfatos cálcicos se presentan como una alternativa prometedora para su uso en la regeneración ósea por ser biocompatibles, osteoconductores y reabsorbibles. Estas cerámicas se sintetizan a altas temperaturas, lo que supone un inconveniente, ya que condiciona el tamaño y la forma que debe definirse antes de la implantación, causando problemas tanto de adaptación al defecto como de fijación en la cavidad donde deben ir colocados ^[11, 12, 13].

En 1983 Brown y Chow ^[14] publicaron el primer estudio sobre un cemento de fosfato cálcico (CFC), que suponía la posibilidad de obtener hidroxiapatita en forma monolítica a temperatura ambiente o corporal, mediante una reacción de tipo cementante. Los cementos se caracterizan por tener dos fases: una fase sólida (formada por uno o varios fosfatos cálcicos) en forma de polvo, y otra fase líquida que suele ser agua o una solución acuosa. Cuando se mezclan ambas fases se forma una pasta moldeable que se adapta a la forma del defecto a rellenar, logrando un mayor contacto con el defecto óseo. Pasado algún tiempo la pasta se endurece, siendo su principal ventaja que fragua a temperatura ambiente a diferencia de las cerámicas que se forman a altas temperaturas ^[13].

Dependiendo de los reactivos empleados podemos obtener diferentes productos finales de la reacción química, dividiéndose principalmente en dos familias de cemento de fosfato cálcico: las que obtienen HA o las de brushita descritas por Lemaitre en 1987 ^[15]. Los cementos de brushita poseen la capacidad de reabsorberse mucho más rápido que los de HA, por lo que podrían estar enfocados a situaciones en las que se necesita regeneración ósea. Estos cementos se reabsorben mayoritariamente por procesos de disolución y reabsorción activa, mediados por la actividad celular, en la que los osteoclastos van degradando el material por capas. En los cementos de HA este proceso es demasiado lento por su estabilidad química en condiciones fisiológicas de

temperatura y humedad. El empleo de cerámicas de brushita podría mejorar la velocidad de reabsorción de los cementos y por tanto la formación de hueso ^[13].

El uso de los CFC se ha incrementando paulatinamente despertando el interés, tanto científico como industrial. Desde su descubrimiento se ha tratado de mejorar las propiedades químico-físicas y biológicas de estos cementos, con objeto de obtener la respuesta final deseada por parte de estos materiales, que es la de producir nuevo hueso allí dónde se necesite. Las propiedades de fraguado y endurecimiento de un cemento pueden ajustarse modificando distintas variables en su procesado, como la composición química de los reactivos y el tamaño de las partículas. Esto hace que los cementos sean materiales muy versátiles, que pueden adaptarse a distintos requisitos clínicos para diversas aplicaciones ^[13].

La sustitución iónica puede aportar cambios estructurales en las matrices de estos cementos con el fin de mejorar estos sustitutos óseos, modificando algunas de sus propiedades. Estas sustituciones iónicas en los cementos se han logrado con éxito con iones de estroncio, realizada por Alkhraisat ^[16], o con iones de magnesio por Cabrejos ^[17]. Creemos que el silicio (Si), puede aportar cambios de interés debido a la importancia que tiene este para los procesos metabólicos, asociados con el desarrollo del hueso y los tejidos conjuntivos. Así como para mantener la salud vascular, como sugiere la publicación de Carlisle de 1970, imprescindible en los procesos de formación de hueso ^[18].

Algunos estudios evidencian que el contenido de silicio en la apatita ósea es mayor durante los procesos iniciales de mineralización, descendiendo en los estados más avanzados al incrementarse el porcentaje Ca/P (calcio/fósforo) para la formación de hidroxiapatita (HA) ^[18,19]. Este ion ya se ha incorporado anteriormente en otros estudios que trabajaban con otro tipo de fosfatos cálcicos ^[20], como la HA y el fosfato tricálcico- α realizados por Hing et al. ^[21] y Camiré et al. ^[22] respectivamente, o más recientemente en el fosfato tricálcico- β realizado en la tesis de Manchón ^[23]. Algunos de estos estudios han obtenido excelentes resultados en cuanto a comportamiento biológico, tanto en la proliferación y actividad celular *in vitro*, como en la regeneración ósea *in vivo* ^[21, 22, 24, 25]. Sin embargo no existen estudios en los que se haya dopado a los cementos de brushita con iones de silicio.

Antecedentes y justificación

El objeto del presente estudio es dopar los CFC con silicio y analizar los cambios que se producirán en la caracterización de sus propiedades físico-químicas y en la reacción de fraguado. También se estudiará la citocompatibilidad mediante una línea celular de osteoblastos, así como su comportamiento *in vivo*. Además los cementos de fosfato cálcico son materiales ideales para transportar medicamentos. La posibilidad de utilizar los CFC como vehículos para el suministro controlado y vectorización de fármacos representan una alternativa para el tratamiento de enfermedades como tumores óseos, osteoporosis o la osteomielitis. En las cerámicas solo existe la posibilidad de incorporar el medicamento mediante adsorción, por lo que el fármaco quedará prácticamente en su totalidad en la superficie. Los cementos añaden la posibilidad de agregarlo en una de las dos fases que se utilizan en la reacción de fraguado, por lo que el fármaco se distribuiría a todo el volumen del material.

III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis de trabajo

El uso de cerámicas dopadas con silicio podría ser un método eficaz para mejorar las funciones de los cementos de brushita como biomaterial para la regeneración ósea. Al introducir los iones de silicio en el cemento, surgirían cambios en su estructura cristalina, así como en sus propiedades mecánicas, físico-químicas y en la capacidad de los cementos para la liberación de medicamentos, manifestándose en mejorar la bioactividad de los cementos, su función como soporte para el crecimiento celular y su comportamiento *in vivo*.

IV.- OBJETIVOS

Objetivos

1. Evaluar el efecto de la incorporación de silicio en cementos de fosfato cálcico en relación con sus propiedades químico-físicas, así como la caracterización del nuevo material. Los parámetros utilizados serán patrones de difracción de rayos X, morfología de los cristales, tiempo de fraguado, fuerza de tensión diametral, porosidad, área de superficie específica y liberación de iones.
2. Estudiar la citocompatibilidad *in vitro* del cemento modificado con silicio utilizando una línea celular de osteoblastos.
3. Incorporar un fármaco mediante dos sistemas diferentes, adsorción o en la fase sólida del cemento, para evaluar la capacidad de liberación del antibiótico y su actividad antimicrobiana.
4. Evaluar la regeneración ósea conseguida *in vivo*, por el cemento modificado con silicio, en calota de conejos como modelo de experimentación animal.

V.- GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Glosario de abreviaturas

ACP: Fosfato cálcico amorfo

BMP: Proteína morfogénica osea

BMU: unidad de modelado óseo

CC: carbonato cálcico

CDHA: Hidroxiapatita deficiente en calcio

CFC: Cemento de fosfato cálcico

DCPA: fosfato dicálcico anhidro o moentita

DCPD: fosfato dicalcico dihiratado o brushita

EGF: factor de crecimiento epidérmico

FCB: fosfato cálcico bifásico

α -FGF y β -FGF: factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico

HA: Hidroxiapatita

HAP: hidroxiapatita precipitada

IGF-I y II: factor del crecimiento insulínico I y II

MCPA: fosfato monocálcico anhidro

MCPM: fosfato monocálcico monohidratado

OCP: fosfato octacálcico

PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PMMA: Polimetilmetacrilato

PTH: hormona paratiroidea

RANK: receptor activador de NF-kB

RANKL: ligando de unión al receptor activador de NF-kB

Si: silicio

Si-CFC: cemento de fosfato cálcico sustituido por silicio

Si-TCP: fosfato tricálcico beta sustituido por silicio

TGF- β 1: factor del crecimiento transformador

TTCP: fosfato tetracálcico

VEGF: factor del crecimiento vascular

α -TCP: fosfato tricálcico alfa

β -TCP: fosfato tricálcico beta

VI.- INTRODUCCIÓN

1. **TEJIDO ÓSEO**

1.1 **ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO**

El hueso está compuesto por células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. Por peso, el hueso mineral y la dentina contienen aproximadamente, 60% de mineral, 10% de agua y 30% de matriz orgánica (90% colágeno tipo I y 10% proteoglicanos y otras proteínas no colágenas) ^[10, 26].

1.1.1 COMPONENTE CELULAR

Células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas o “stem cells”

Son células de origen mesenquimal, localizadas en la médula ósea roja que pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a las diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes. Fue Cohnheim en 1867 el primero que sugirió la presencia de estas células pluripotenciales de origen mesenquimatoso en la médula ósea, y Friedenstein en 1976 ^[27] demostró que estas células eran las precursoras de distintos fenotipos celulares ^[26].

Las propiedades que definen a este tipo de células son:

- Que no están diferenciadas sino a mitad de camino de la diferenciación.
- Se pueden dividir indefinidamente.
- Al dividirse, cada célula hija puede especializarse en distintas direcciones ^[28].

Con respecto al linaje osteogénico, la célula madre mesenquimal sufre unas etapas de diferenciación siguiendo la secuencia: célula mesenquimal madre (stem cell) → osteoprogenitor inmaduro → osteoprogenitor maduro → pre-osteoblasto → osteoblasto maduro → osteocito o célula tapizante ^[10].

La diferenciación de estas células en cada linaje específico es un proceso complejo que implica muchas transiciones celulares. La progresión de una etapa a la siguiente depende de la presencia de factores específicos del entorno, cuya contribución dirige el fenómeno de diferenciación. En esta diferenciación tienen un papel activo las proteínas morfogenéticas y los factores de crecimiento.

Introducción

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. Los osteoblastos en su diferenciación expresan diferentes macromoléculas de la matriz ósea, como son el colágeno tipo I y la osteopontina que se expresan de forma temprana en las células osteoprogenitoras. Igualmente la fosfatasa alcalina, una proteína de superficie, podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. Mientras que la sialoproteína ósea y la osteocalcina, al aparecer al inicio de la mineralización, actuarían como marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto a osteoblasto [26].

Osteoblastos

Son células de origen mesenquimal muy diferenciadas, no migratorias, grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso [26].

Actualmente se sabe que:

- Sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
- Dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular.
- Contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide gracias a la fosfatasa alcalina.
- Median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas.
- Sintetiza factores de crecimiento [28].

Según su estadio madurativo se pueden dividir en:

- Osteoblastos activos: células cuboideas, mononucleadas, ricas en fosfatasa alcalina, que sintetizan y segregan colágeno tipo I, glicoproteínas (osteopontina y osteocalcina), citoquinas y factores de crecimiento en la matriz ósea no mineralizada (osteoide), entre los cuerpos celulares y la matriz mineralizada. Emiten procesos citoplasmáticos a través de la matriz, que comunican con la red de osteocitos y osteoblastos vecinos, que se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, permitiendo el paso de mensajeros como el calcio, citoquinas o prostaglandinas. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica (2-3 μm por día) que consiste principalmente colágeno tipo I y expresan

Introducción

una enzima característica, la fosfatasa alcalina, que permite su posterior mineralización (1-2 μm por día) depositando una fase inorgánica de cristales de fosfato cálcico (HA), que se encuentran en el medio extracelular en forma de solución sobresaturada, adquiriendo un espesor de 20 μm tras un periodo de maduración que puede durar unos 10 días. La vida media de los osteoblastos es de 1-10 semanas, después de lo cual pueden desaparecer mediante mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes de revestimiento o en osteocitos (15%).

- Osteocitos: son osteoblastos que quedan atrapados dentro de la matriz ósea, alojados en lagunas osteocíticas y son los responsables del mantenimiento de la homeostasis del hueso, siendo incapaces de renovarse. Su metabolismo es crucial para la viabilidad del hueso. Son las células más abundantes del hueso, con forma estrellada su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que son vías ideales para la comunicación química, eléctrica y de líquidos a través de la densa matriz ósea. Estos conductos están llenos de fluido óseo extracelular, para asegurarse oxígeno y nutrientes. La función principal de los osteocitos es la de controlar el remodelado óseo, detectando variaciones de las cargas (mecanotransducción). Su vida media es de varios años o décadas.

- Células óseas tapizantes: se encuentra a lo largo de las superficies del hueso que no sufre ni formación ni resorción ósea. Constituyendo con el endotelio una capa protectora de la superficie ósea y participando en la activación del remodelado óseo.

- Osteoblastos inactivos: son células elongadas, con núcleo en forma de huso sin apenas organelas, indistinguibles morfológicamente de las células tapizantes ^[26, 28, 10, 29].

Osteoclastos

Son derivados de las células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM) precursoras de macrófagos y monocitos. Los osteoclastos están encargados de la reabsorción ósea. Es una célula grande (100 μm), multinucleada y polar, en su polo basal es donde se hallan los núcleos y el polo apical tiene un borde plegado o en cepillo que se une a la matriz ósea mineralizada formando una especie de anillo, denominada zona de sellado, en la que produce la reabsorción ósea. Los osteoclastos contienen

Introducción

fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas.

Los moduladores más importantes para el desarrollo de los osteoclastos son las interleuquinas-1, 3, 6 y 11 (principal factor de control para el desarrollo de los osteoclastos), junto con TGF- α (factor del crecimiento transformador- α) y las citoquinas RANKL (ligando de unión al Receptor Activador de NF-kB) y RANK (Receptor Activador de NF-kB). Los propios osteoblastos también promueven la formación y función de los osteoclastos que activa la dinámica de reabsorción [26, 10]. Los osteoclastos viajan a través del torrente sanguíneo hasta los lugares de reabsorción del hueso. Cuando los osteoblastos se dispersan en respuesta a la PTH (hormona paratiroidea), los osteoclastos tienen la oportunidad de unirse a la superficie osteoide mineralizada, y junto a ellos se adhieren a la superficie moléculas como las integrinas y osteopontina que afianzan la unión de los osteoclastos al hueso. Dentro de esa zona de unión se desarrolla un borde rugoso, donde se forman cavidades festoneadas irregulares denominadas lagunas de Howship debido a la secreción de anhidrasa carbónica, que libera en el área dióxido de carbono, agua y protones. A este nivel el pH es ácido, facilitando la solubilidad de la matriz inorgánica de calcio y fósforo y exponiendo la matriz orgánica a las enzimas proteolíticas [28, 29, 30, 31].

1.1.2 MATRIZ ORGÁNICA

La matriz orgánica representa un tercio del peso óseo, aproximadamente el 35% del peso de hueso deshidratado. Está formada principalmente por proteínas destacando el colágeno tipo I (90%), que constituye el molde para la sedimentación de fosfato cálcico, sus fibras van adquiriendo capas con diferentes orientaciones que contribuyen a la solidez de la matriz. Además tiene otras numerosas proteínas que incluyen pequeñas cantidades de otros tipos de colágeno llamadas proteínas “no colágeno”. Estas representan el 10% de las proteínas totales del hueso y pueden servir para la formación directa de fibras, mineralización del hueso, regulación de la unión de las células del hueso a su matriz y la formación y reabsorción ósea. Algunas de estas proteínas contienen carbohidratos, los llamados proteoglicanos, otras están fosforiladas y esto las capacita para fijar calcio y regular la mineralización. La composición proteica de la matriz variará en función del tipo de hueso esponjoso o compacto [26, 28].

Colágeno

Es la proteína más abundante del hueso constituye el 90% de la matriz extracelular, principalmente de tipo I (95%) y V (5%), es sintetizada por los osteoblastos como procolágeno, que es una proteína con extensiones no helicoidales en ambos extremos de la molécula, cuando se segrega al medio extracelular pierde por peptidasas específicas las extensiones y se convierte en colágeno maduro. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrogeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina entre hidroxilisinas y lisinas. En la molécula de colágeno se encuentra la secuencia Arg-Gly-Asp que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas. Contiene también el aminoácido hidroxiprolina, siendo un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno. No tiene afinidad por el calcio por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral. Sus valores de excreción urinaria están en relación directa con la tasa de reabsorción ósea [26].

Los cristales de HA están unidos con firmeza a cada segmento de fibra colágena. Esta unión impide el “deslizamiento” del hueso, evitando que los cristales y las fibras colágenas se desplacen y salgan de su lugar, lo que es esencial para proporcionar fuerza al hueso. Además los segmentos de fibras colágenas vecinas se superponen, haciendo que los cristales de HA se distribuyan a modo de ladrillos unidos en un muro [28].

Proteínas no colágenas

Constan de mucopolisacáridos ácidos, algunas se sintetizan por las células óseas y están involucradas en regular la mineralización y remodelado óseo. Dichas proteínas son multifuncionales y su control esta mediado por el efecto “feedback” en los osteoblastos [16].

Entre ellas destacan:

- Proteoglicanos: representan el 10% de las proteínas no colágenas. En la matriz osteoide existen cuatro tipos:

El hialurano y condroitín sulfato que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Y el biglinato y la decorita, que aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.

Introducción

- Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico: son la osteocalcina y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxi-glutámico, este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis.

La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependientes de la vitamina K. Sus niveles plasmáticos se consideran como un marcador bioquímico de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad osteoclastica.

- Glicoproteínas: son la osteonectina, la fosfatasa alcalina, y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp).

La osteonectina es una glicoproteína con afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y la HA. Interviene en la regularización de la adhesión celular entre matriz y células, necesarias en el proceso de mineralización.

La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico necesario para la mineralización. Se le considera un buen marcador de la actividad osteoblástica.

Las proteínas con el tripéptido (RGD) son principalmente cinco: Osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, gracias a su secuencia de Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y osteoclastos. También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales. La sialoproteína ósea tiene una alta afinidad por la HA y promueve la nucleación de esta, siendo alta en zonas de formación ósea inhibiendo la reabsorción ósea. La osteopontina es un inhibidor potente de la formación de HA, tiene la secuencia RGD que promueve la adhesión celular e interviene en la regulación de la movilidad de osteoclastos en la reabsorción ósea ^[26].

Proteínas procedentes del plasma

Se encuentran en la matriz orgánica en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la α 2-SG-glicoproteína, relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide ^[28].

Factores de crecimiento

Son polipéptidos sintetizados principalmente en la matriz ósea o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas,...), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina. Actúan sobre las células indiferenciadas osteoprogenitoras locales pudiendo desencadenar la diferenciación, de las células mesenquimales en osteoblastos, estimulando la mineralización y formación del hueso, por ello se dice que son osteoinductivas. Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos de membrana o diana situados en la superficie de las células sobre las que actúan ^[28].

Entre los que destacan:

- **IGF-I y II (factor del crecimiento insulínico I y II)**: están sintetizados por el hígado y los osteoblastos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide, incrementando el número y la función de los osteoblastos y favoreciendo la síntesis de colágeno tipo I. Estos a su vez están regulados por hormonas y factores de crecimiento. La GH (hormona de crecimiento), los estrógenos y la progesterona, aumentan su producción mientras que los glucocorticoides la inhiben. Median en la interacción osteoblasto-osteoclasto formando parte del proceso de remodelado óseo. Regulan la formación de hueso de forma autocrina, aumentan el número de células multinucleadas osteoclásticas y actúan como un factor quimiotáctico para las células progenitoras mesenquimales derivadas de la médula ósea ^[28, 32, 33, 34].

- **TGF- β 1 (factor del crecimiento transformador)**: homodímero, no glicosilado que se secreta de forma inactiva o latente. En su forma libre tiene una vida media de 2 minutos, mientras que en su forma latente es de 90 minutos, pero para que exista actividad biológica debe estar en su forma libre. Permanece de forma latente en la matriz ósea y ante la reabsorción osteoclástica es cuando se activa, estimulando la formación ósea, mediante la diferenciación de osteoblastos, la síntesis de matriz osteoide e inhibiendo la síntesis de proteasas. Además inhibe la reabsorción, al reducir la formación,

Introducción

diferenciación y actividad de los osteoclastos. Para que ejerza su acción deberá interaccionar con los receptores TGFRI I y II. Prácticamente todas las células sintetizan TGF y expresan receptores, por lo que afectara a todos los procesos fisiológicos.

Tienen 3 papeles fundamentales:

- Modular la proliferación celular, normalmente como supresor.
- Mejorar la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación.
- Efecto inmunosupresor a través de varios mecanismos.

Estas proteínas incluyen citoquinas que contribuyen a la reparación del tejido conjuntivo y la regeneración ósea, activando a los fibroblastos para que formen procolágeno, que deposita colágeno tipo I. El hueso es el almacén del TGF- β más abundante del cuerpo, que actúa como un agente mitogénico débil para las células osteoblásticas humanas [28, 32, 33, 34].

- BMPs (proteínas morfogenéticas óseas): son capaces de transformar el tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se las consideraría osteoinductivas, así como de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares. Dirigen el desarrollo embriológico de las células, tejidos y órganos, además tienen un papel importante en la fisiología postfetal. Las BMP se diferencian de otros factores de crecimiento en que pueden encontrarse en la matriz ósea extracelular e inducir la diferenciación de las células mesenquimales a condroblastos u osteoblastos, pero no tienen propiedades mitogénicas [28, 32].

- PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas): se encontró por primera vez en las plaquetas, de ahí su nombre, aunque también lo producen macrófagos y células endoteliales. Es una proteína que se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas, y se libera cuando las plaquetas se agregan y se inician las cascadas de la coagulación. Las plaquetas activadas favorecen la hemostasia atrayendo a más plaquetas, que liberan trombina, tromboxano A₂ y adenosina difosfato. Tiene propiedades quimiotácticas, reclutando células mesenquimales, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas, neutrófilos y células mononucleares, dichas células migran hacia el tejido dañado y tienen un papel activo en la regeneración.

Introducción

Los papeles fundamentales de los PDGF en el modelado y remodelado son:

- Aumentar el número de células necesarias para la formación de hueso en la zona de reparación.
 - Desencadenar la formación de capilares mediante su potente actividad mitótica.
 - Estimular el desbridamiento de la zona.
 - Proporcionar una fuente continua de factores de crecimiento para la reparación ósea [28, 32, 33, 34].
- VEGF (factor del crecimiento vascular): proteína homodimérica, mitógeno potente y selectivo para células endoteliales. Induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce un aumento de la permeabilidad celular y la vasodilatación. Aparece en situaciones de hipoxia, siendo clave en el desarrollo de las primeras fases de los procesos de reparación y regeneración óseas [28, 32].
- α -FGF y β -FGF (factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico): son proteínas de cadena sencilla que se originan a partir de precursores diferentes. Tienen un papel importante en los mecanismos de regeneración tisular. Estimulan la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la reparación: células capilares endoteliales, células vasculares endoteliales, fibroblastos, queratinocitos y algunas células especializadas como condrocitos, mioblastos y osteoblastos. El FGF básico induce la migración celular [28, 32, 34].
- EGF (factor de crecimiento epidérmico): su molécula precursora es una glucoproteína de membrana y de gran tamaño que mediante proteólisis origina el fragmento EGF. Su estructura es similar al TGF- α , uniéndose a los mismos receptores. Ambos estimulan la mitosis de los fibroblastos y los queratinocitos y aceleran el cierre de las heridas. Se sintetiza en riñón, glándula submandibular, glándula lacrimal, glándula de Brunner y megaqueratinocitos. Se encuentra en la orina, la saliva y las lágrimas. Favorece la reparación de las heridas estimulando la migración y división de las células epiteliales y aumentando la síntesis de proteínas como la fibronectina [28, 32].

Otros factores de crecimiento como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) y M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) están implicados en procesos de osteoclastogénesis [28, 32]

Introducción

1.1.3 FASE MINERAL

La matriz inorgánica o mineralizada, supone del 60-70% del hueso deshidratado. Contiene, aproximadamente, un 99% del calcio, un 85% del fósforo y alrededor de un 40 y 60% del sodio y magnesio que contiene el organismo ^[26, 28].

Los cristales minerales de hueso se clasifican como apatita, debido a su composición que contiene carbonatos y combinaciones de fosfato y calcio amorfas. En el medio extracelular existe una solución supersaturada de calcio y fosfato, aunque en el equilibrio homeostático solo los dientes y los huesos se mineralizarán ^[28]. Las sales cristalinas que se depositan en la matriz orgánica del hueso se componen sobre todo de calcio y fosfato, la fórmula de la sal cristalina más importante es la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Cada cristal tiene forma de placa delgada y alargada, de 400 Å de grosor y 100 Å de ancho. La relación relativa de calcio y fósforo puede variar mucho en distintas condiciones de alimentación; dicha relación Ca/P, en términos de masa, oscila entre 1.3 y 2.0 ^[35, 36].

También existen entre las sales del hueso iones de magnesio, sodio, potasio, carbonato manganeso y flúor; sin embargo los estudios de difracción de rayos X no permiten individualizar sus cristales. Por lo tanto parece que se encuentran absorbidos en la superficie de los cristales de hidroxiapatita (HA), en lugar de estar organizados en cristales propios y distintos ^[35].

El proceso de mineralización de los huesos, la dentina y el esmalte es diferente. En el hueso mineral y la dentina, la apatita comienza formando un pequeño núcleo (nucleación) dentro de nanoporos presentes en las fibrillas colágenas, es como un fluido extracelular sobresaturado en iones de calcio y fósforo. Esta heterogénea nucleación es catalizada por grupos de ésteres de fosfato y carboxilados en la superficie de las fibras colágenas; finalmente estos núcleos acaban interconectando en toda la red colágena dando lugar a láminas de forma irregular y tamaño variable entre 20 y 1100 Å. Esta característica hace que haya una gran superficie de contacto con el líquido extracelular que permite los intercambios ^[10].

Las diferencias físico-químicas entre las hidroxiapatitas humanas del hueso mineral, la dentina y el esmalte están relacionadas con sus diferentes funciones

Introducción

biológicas, requerimientos mecánicos y homeostasis del calcio en los huesos y la dentina; así como la resistencia al ácido o a la abrasión durante la masticación en el caso del esmalte.

La regulación de la homeostasis mineral se centra en tres iones: calcio, fosfato y magnesio, con modulación de su concentración por la vitamina D3, PTH y calcitonina. El precursor de la vitamina D primero se activa en la piel, por los rayos UV del sol, y se convierte en 25-hidroxicolecalciferol en el hígado, a continuación se forma en el riñón 1,25-dihidroxicolecalciferol. Esta vitamina D activa promueve la formación de proteínas, a las que se les adhiere el calcio en el epitelio intestinal, favoreciendo la reabsorción de calcio y fosfato. La hormona paratiroidea promueve la reabsorción del calcio en los riñones y activa los osteoblastos, que a su vez expresan una serie de factores que activan la reabsorción del hueso por parte de los osteoclastos, liberando por tanto calcio. Mientras que la calcitonina apaga la actividad osteoclástica y facilita la recuperación del nivel basal de calcio ^[28, 37].

1.2 TIPOS DE TEJIDO ÓSEO

La presencia de estructuras mineralizadas es evidente en algunos animales inferiores, pero es en los vertebrados donde alcanza su máximo desarrollo, en relación con el peso que tienen que soportar. El hueso posee una estructura dual básica, la cortical externa recubre el hueso, se caracteriza por ser una superficie lisa, continua y densa ($1,80 \text{ g/cm}^3$); mientras que la cortical interna, se caracteriza por un hueso esponjoso con un promedio de porosidad del 75-95% y un promedio de densidad de $0,2 \text{ g/cm}^3$. Estas características pueden variar con la edad y dependerán de su localización, teniendo en cuenta que los cambios que se produzcan en el hueso repercutirán en su función ^[10].

El tejido óseo compacto forma las capas externas de los huesos planos, de los cortos y de las epífisis de los huesos largos, así como las diáfisis de los huesos largos. Mientras que el tejido óseo esponjoso, forma el interior de los huesos planos, de los cortos y de las epífisis de los huesos largos. Los huesos maxilofaciales siguen la distribución macroscópica de los huesos planos de la bóveda craneal, compuestos por una cortical interna, otra externa y entre ambas una zona de hueso esponjoso. El maxilar tiene esta distribución en la mayor parte de su superficie, excepto en la zona de la

Introducción

tuberosidad en donde adquiere la morfología de los huesos cortos, con corticales muy finas y una gran cantidad de hueso esponjoso ^[28].

El **hueso cortical o compacto** se estructura mediante conductos que contienen capilares, vénulas y a veces arteriolas, llamados conductos de Havers (alineados según el eje longitudinal del hueso). Están recubiertos de laminillas que se distribuyen de forma concéntrica en los huesos largos, y se pliegan en espiral en sentido horario y antihorario, para asegurar la máxima repuesta a las cargas de torsión. Entre ellas se ubican lagunas, donde se sitúan los osteocitos. De cada laguna se irradian canículas ramificadas que permiten la comunicación y nutrición de los osteocitos. Cada conducto de Havers, con sus laminillas óseas, los canalículos y las lagunas que albergan los osteocitos recibe el nombre de osteona o sistema de Havers (Figura 1) ^[31]. Un sistema de Havers está formado entre 4 y 20 anillos concéntricos, el diámetro medio en humanos es de unas 200-300 μm , el diámetro interno puede variar entre 20-120 μm y la longitud 3-5 mm. Cada uno de los anillos está poblado por un número variable de osteocitos, unido a otros osteocitos de la misma laminilla, o a osteocitos de laminillas adyacentes, a través de una red de hilos finísimos que atraviesan el canículo. Las laminillas circunferenciales y las endosteales, están orientadas paralelamente a la superficie externa e interna del hueso, por debajo del periostio y del endostio respectivamente, mientras que las laminillas intersticiales se ubican entre los sistemas haversianos. Los canales de Volkmann son un segundo sistema de canales que penetran en el hueso de manera aproximadamente perpendicular a su superficie interna y externa del hueso, que lo atraviesa en dirección oblicua. Así, los vasos de los canales de Volkmann comunican con los vasos de los canales de Havers, con los vasos del endostio y del periostio ^[28, 29, 31].

El **hueso esponjoso o trabecular** lo constituyen laminillas óseas en forma de red tridimensional, que forman espículas o trabéculas irregulares, que delimitan cavidades areolares, en cuyo interior se encuentra la médula ósea roja encargada de la formación de las células sanguíneas, que participan en el mantenimiento y la organización del hueso (osteoclastos y osteoblastos), y son el reservorio que mantiene la homeostasis mineral del organismo. La trabécula se alinea al azar generalmente, aunque en ciertas localizaciones anatómicas la trabécula se alinea en una dirección para soportar la carga. Los vasos sanguíneos quedan fuera de las laminillas y los osteocitos se hallan

Introducción

siempre a una distancia de los capilares sanguíneos menor de 0,2 mm, quedando así limitado el espesor de las espículas óseas [28, 29, 31].

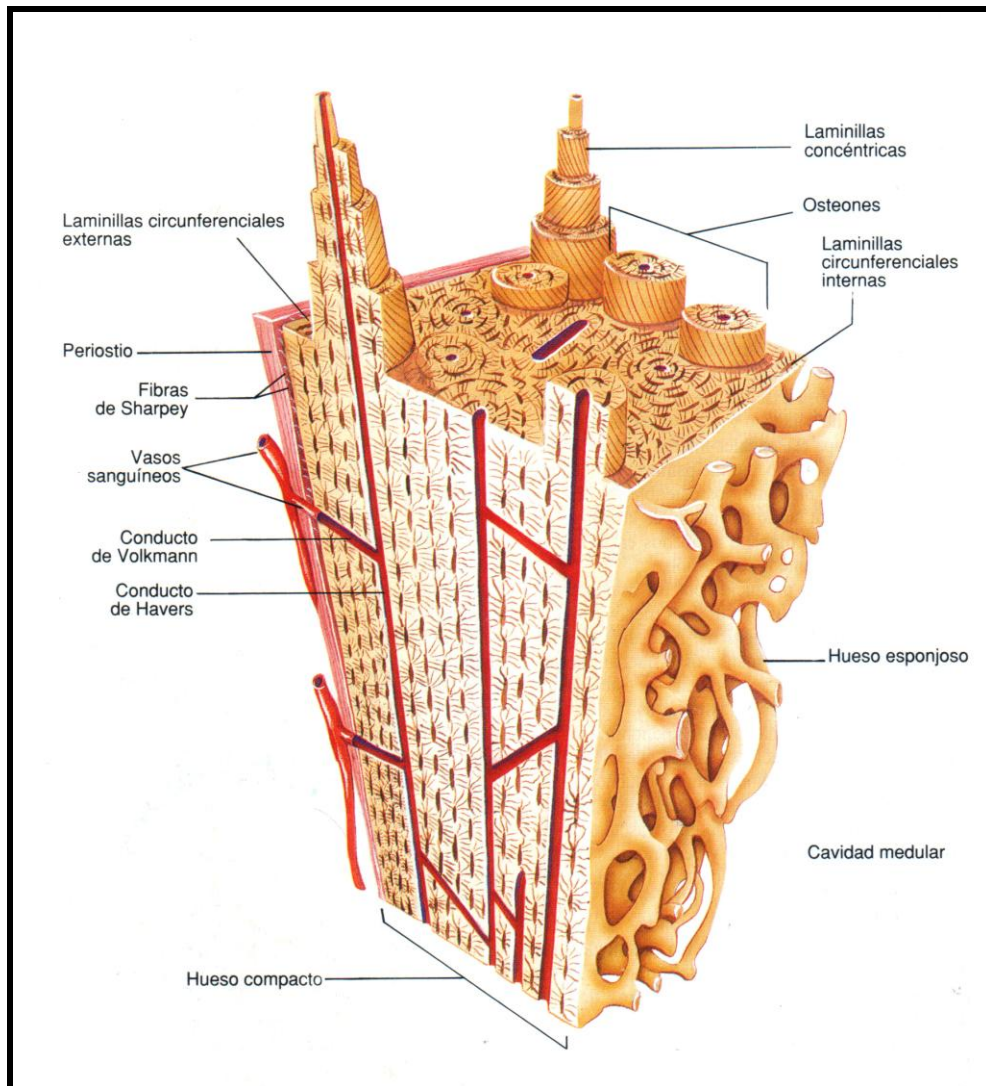


Figura 1: Esquema morfológico de la estructura ósea [31].

El periostio y endostio son cubiertas de tejido conectivo especializado que recubren, respectivamente, el exterior y el interior del hueso.

En el **periostio** se distinguen dos capas, una más externa, en la que predominan las fibras colágenas sobre las células, es rica en vasos sanguíneos que se introducen en los canículos intraóseos; y otra más interna, en contacto con el hueso, con mayor proporción de células. Estas células son características de células mesenquimales

Introducción

indiferenciadas, son osteoprogenitoras, es decir, capaces de diferenciarse en osteoblastos.

El **endostio** tapiza la cavidad medular de los huesos largos, los conductos de Volkmann y de Havers del hueso compacto, y los espacios medulares del esponjoso. Las células mesenquimales indiferenciadas MSCs (Mesenchymal Stem Cells) que contiene en su interior tienen potencialidad osteogénica y hematopoyética ^[28, 29, 31, 38, 39].

1.3. PROPIEDADES MECÁNICAS DEL TEJIDO ÓSEO

Las propiedades mecánicas del hueso se caracterizan por una alta rigidez (78,8-151,0 MPa en dirección longitudinal y 51,0-56,0 MPa en dirección transversal) y elasticidad (17,0-20,0 GPa en sentido longitudinal y 6,0-13,0 GPa en dirección transversal), lo cual aún no se ha podido obtener con materiales sintéticos. Las propiedades mecánicas del hueso se deben principalmente a su microestructura que combina una matriz orgánica, en la que las fibras de colágeno aportan una gran fuerza de tensión, con cristales minerales, que aportan gran fuerza de compresión. Estos cristales se encuentran orientados en sentido longitudinal al hueso dándole una mayor fuerza y rigidez en el eje longitudinal que en el transversal. Además el tejido óseo tiene otras funciones como la de proteger órganos vitales, soportar la movilidad y la masticación ^[10].

2. OSIFICACIÓN, REMODELADO Y REPARACIÓN ÓSEA

2.1 OSIFICACIÓN

2.1.1 TIPOS DE OSIFICACIÓN

La formación del tejido óseo se realiza bien sobre un modelo previo de tejido conjuntivo, osificación endo-conjuntiva, directa o membranosa; o bien sobre un modelo de tejido cartilaginoso, osificación endocondral.

Osificación intamembranosa o directa

Este tipo de osificación comienza en el periodo fetal sobre un tejido conjuntivo fetal condensado rico en células, y continua a lo largo de la vida en el desarrollo de los

Introducción

huesos planos del cráneo, gran parte de los huesos de la cara y maxilar, partes de la mandíbula y la clavícula.

Se desarrolla en una membrana de mesénquima muy vascularizada en donde las células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos (a través de las células osteoprogenitoras), que comienzan a sintetizar matriz ósea y así forman espículas óseas, que se desarrollan y fusionan con otras espículas para formar trabéculas óseas. Conforme surgen más y más trabéculas en la misma región se interconectan, después de unos días se deposita sales de calcio y otros minerales, endureciendo la matriz (calcificándola) formando un tejido óseo más organizado, fuerte y laminar. A medida que se fusionan entre si generan tejido óseo esponjoso, que será remodelado para dar origen al tejido óseo compacto. La superficie de estas trabéculas está poblada de osteoblastos. Con frecuencia puede verse un tipo celular adicional el osteoclasto. Estas células multinucleadas grandes, que derivan de los monocitos, se encuentran en depresiones poco profundas de la superficie trabecular denominadas lagunas de Howship y actúan en la resorción ósea. El hueso se remodela por medio de la acción coordinada de osteoblastos y osteoclastos. La región de la membrana mesenquimática que no participa en el proceso de osificación permanecerá como el componente de tejido blando del hueso (periostio y endostio).

El tejido óseo neoformado se denomina primario o inmaduro porque la disposición de las fibras colágenas no tiene el orden preciso que hay en el tejido más viejo. La interacción coordinada de osteoblastos y osteoclastos lo reemplazará por tejido óseo secundario maduro ^[29, 31].

Osificación endocondral o indirecta

Determina la formación de los huesos largos y cortos. Es más compleja, se realiza sobre un modelo de cartílago hialino (Figura 2: A) que sirve como molde, el cual va siendo paulatinamente eliminado y sustituido por tejido óseo. La vascularización del pericordio diafisario (Figura 2: B2) conduce a la transformación de las células condrogénicas a osteogénicas, que forman un collarite óseo subperióstico (Figura 2: B1) por osificación intramembranosa, que rápidamente es perforado por la actividad osteoclástica. Los condrocitos en el centro del cartílago se hipertrofian (Figura 2: B3), almacenan glucógeno y reabsorben un poco de su matriz, formando lagunas que se

Introducción

hacen confluentes. Después de contribuir a la calcificación de la matriz cartilaginosa, los condrocitos degeneran y mueren.

El collarate subperióstico va aumentando en longitud y anchura (Figura 2: C1), las lagunas confluentes son invadidas por el brote perióstico, compuesto por vasos sanguíneos, células mesenquimáticas y células osteoprogenitoras (Figura 2: C4). Estas últimas se diferencian en osteoblastos y elaboran un revestimiento de matriz ósea sobre el cartílago calcificado, formándose así una cavidad medular primitiva (Figura 2: C5) cuyas paredes están compuestas por complejo cartílago calcificado-hueso calcificado. Este tejido es posteriormente remodelado, es decir, eliminado por osteoclastos y sustituido por hueso nuevo, formando en las epífisis centros de osificación secundarios (Figura 2: C7). El collarate óseo subperióstico (Figura 2: D1) se vuelve lo suficientemente grande como para sostener el hueso largo en desarrollo, de modo que se ha reabsorbido gran parte del cartílago, a excepción del disco epifisario (Figura 2: D8) y el revestimiento de las epífisis (Figura 2: D9). La osificación en las epífisis se produce desde el centro (Figura 2: D10), por lo tanto el periostio vascular (Figura 2: E11) no cubre la superficie cartilaginosa. Los vasos sanguíneos (Figura 2: E12) entran en la epífisis, sin vascularizar el cartílago, para construir la red vascular (Figura 2: E13) alrededor de la cual se formará el hueso esponjoso.

La formación de los huesos largos, tanto en la diáfisis como en la epífisis, se realiza de forma conjunta con la osificación directa, a partir del periostio y del endostio. La remodelación ósea es un proceso continuo de reabsorción por osteoclastos y nuevos depósitos por osteoblastos y osteocitos de tejido óseo, en respuesta a las necesidades mecánicas, metabólicas y hormonales ^[29, 31].

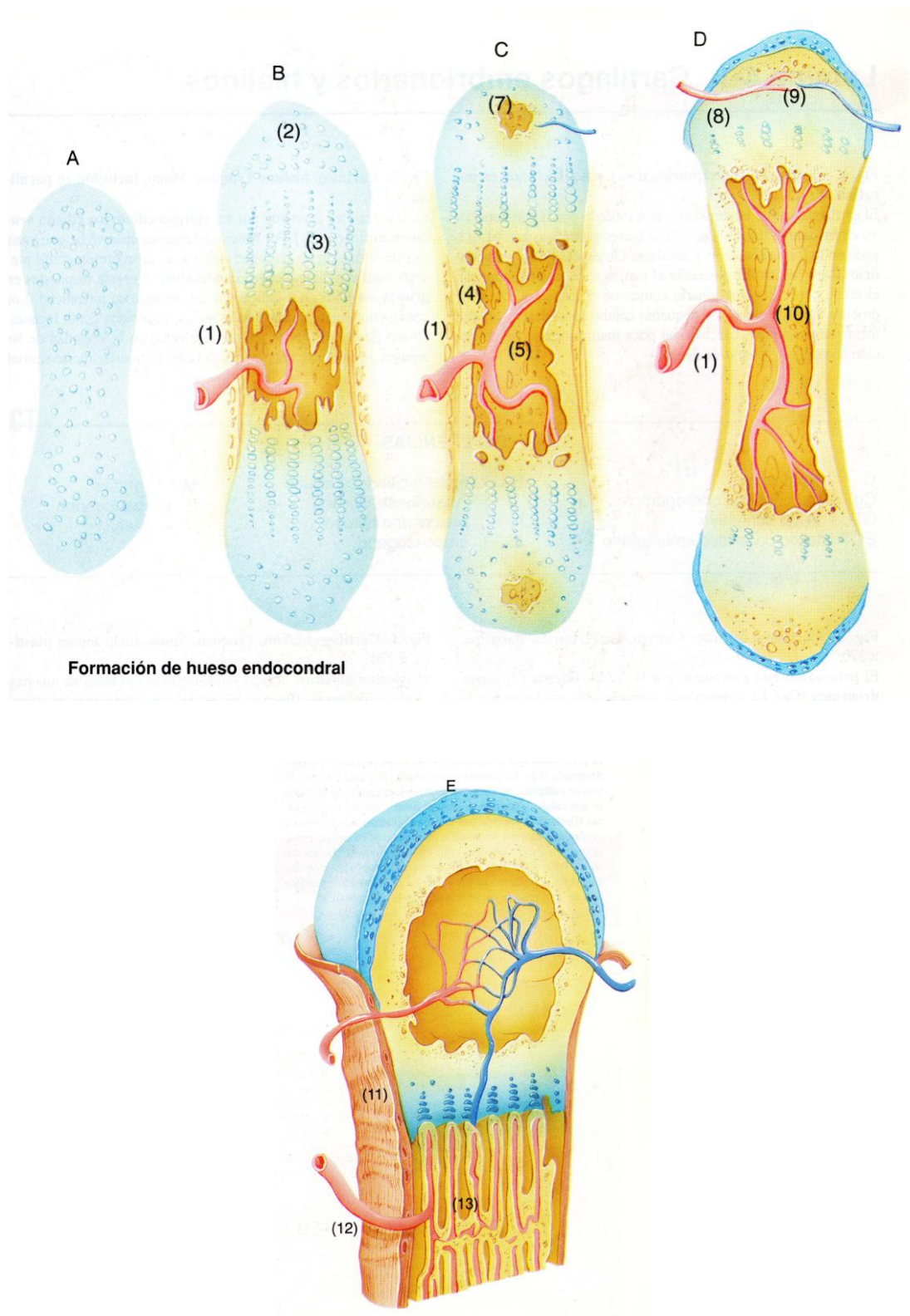


Figura 2: Esquema de la osificación endocondral. ^[31].

2.2 REMODELADO ÓSEO

El tejido óseo es muy activo, tiene una intensa dureza e importante vascularización, necesaria para la actividad metabólica, estando en constante formación y reabsorción. Pero es su gran capacidad de regeneración lo que le hace único, permitiendo un “*restitutio ad integrum*” tras el trauma. El remodelado continuo, permite la renovación de un 5-15% del hueso total al año en condiciones normales. Este proceso consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso, llevada a cabo por los osteoclastos, que forman las lagunas de reabsorción osteoclástica o de Howship, seguida de una etapa de formación de hueso nuevo u osteoide, realizada por los osteoblastos. El grupo de células responsables de este proceso dinámico se las conoce como unidad básica multicelular o unidad de modelado óseo (BMU), y la cantidad de hueso formado por unidad básica multicelular es la unidad básica estructural ^[28, 26, 40]. Esta unidad de actividad funcional se describe como “cutting cone” o cono de corte y relleno, están orientados axialmente, tiene una cabeza de osteoclastos que cortan a través del hueso compacto para formar túneles, y una cola de osteoblastos que forma una osteona secundaria nueva (Figura 3) ^[37]. Las osteonas secundarias son estructuras laminares concéntricas con un borde periférico festoneado, que constituye una línea de detención de la resorción ósea antes de ser llenado con nuevo hueso laminar. Los bordes festoneados de las osteonas secundarias reciben el nombre de líneas de crecimiento, ya que se observa una fina capa de sustancia adhesiva rica en polisacáridos entre el hueso viejo y el neoformado.

El cono de corte avanza a través del hueso compacto a una velocidad aproximada de 30 $\mu\text{m}/\text{día}$. Durante la fase de resorción, el cono de corte abre una cavidad de 120-180 μm de diámetro. La fase de formación ósea de la remodelación es la que más varía entre distintas especies. La cavidad se llena al cabo de 17 semanas en los seres humanos, pero esta cifra varía dependiendo de la especie, reduciéndose a 12 semanas en perros y 6 semanas en conejos ^[41, 37].

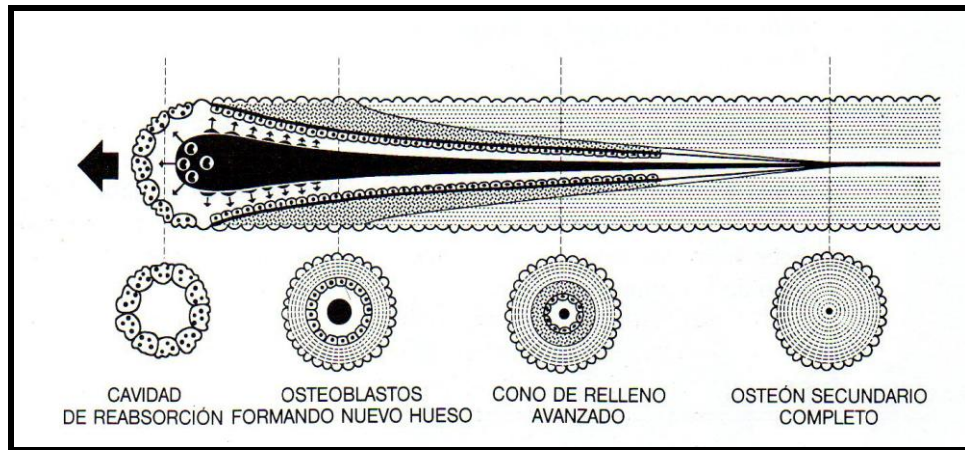


Figura 3: Cono de corte y relleno ^[41].

2.2.1 FASES DEL REMODELADO ÓSEO

El hueso cortical y trabecular se remodelan constantemente mediante un ciclo específico de actividad celular compuesto por las siguientes fases (Figura 4) ^[32]:

Fase quiescente

El hueso está en condiciones de reposo.

Fase de activación

El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de los osteoclastos circundantes procedentes de los vasos próximos ^[32].

Fase de reabsorción

Los osteoclastos comienzan a reabsorber la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es terminado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β , PDGF, IGF-I y II. En el hueso compacto los osteoclastos partiendo de un canal de Havers o de Volkmann, excavan un túnel de sección circular, por ello a las BMU corticales u osteonas tienen forma cilíndrica o de cono. Mientras que en el hueso

Introducción

esponjoso los osteoclastos labran en la superficie de las trabéculas excavaciones poco profundas y de base ancha ^[28, 32, 40].

Fase de formación

Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz, que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs, responsables de la diferenciación. A los pocos días los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas ^[32]. La etapa inicial de la producción de hueso se caracteriza por la secreción de moléculas de colágeno y sustancia fundamental por los osteoblastos. El colágeno se polimeriza rápidamente para producir fibras de colágeno y el tejido resultante se vuelve osteoide, un material que parece cartílago pero que difiere de él porque permite la precipitación en su interior de sales de calcio. Una vez formado el osteoide, algunos osteoblastos quedan aprisionados en él, denominándose osteocitos ^[28, 31, 35]

Fase de mineralización

Después de unos 30 días comienza a precipitarse sales de calcio en la superficie de las fibras colágenas del depósito osteoide, formando nidos que se multiplican y crecen hasta la formación finalmente de cristales de HA. En un principio dichos cristales son amorfos, mediante procesos de sustitución y adición de átomos, estas sales se reforman pasando a constituir cristales de HA. No obstante hasta un 20-30% puede quedar en su forma amorfa. Esto es importante, ya que dichas sales se pueden absorber con facilidad cuando se necesita más calcio en el líquido extracelular ^[35]. Este proceso finaliza a los 130 días en hueso cortical y a los 90 en hueso trabecular ^[32].

En humanos el proceso de remodelado óseo dura de 6 a 9 meses, este periodo de tiempo se le conoce como sigma, sin embargo en otras especies animales como el perro es de 3 meses y para el conejo de 6 semanas, esto deberá tenerse en cuenta a la hora de realizar estudios en animales ^[42, 43].

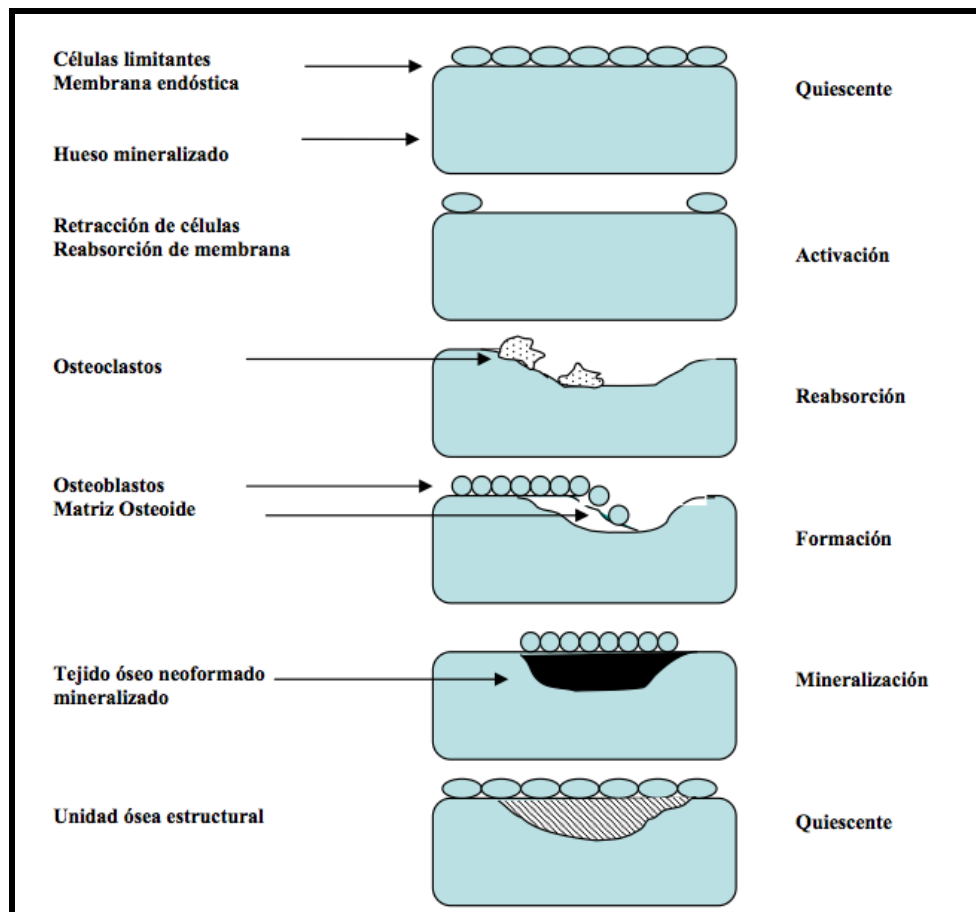


Figura 4: Fases del remodelado óseo ^[32].

2.2.2 FASES DE MADURACIÓN DEL HUESO

Desde el punto de vista microscópico se distinguen cuatro tipos de hueso que corresponden a diferentes fases de su maduración:

Hueso reticular o entrelazado

Es un hueso relativamente débil, desorganizado y poco mineralizado, que surge como respuesta a la cicatrización de las heridas, rellena rápidamente los defectos óseos y proporciona continuidad inicial a las fracturas. Este hueso no se encuentra en el esqueleto adulto en condiciones normales de reposo y se reabsorbe rápidamente si es sometido a carga prematuramente ^[37].

Hueso lamelar

Es un hueso fuerte, muy organizado y mineralizado que supone más del 99% del esqueleto humano adulto. Cuando se forma hueso lamelar nuevo, los osteoblastos

Introducción

depositan una parte del componente mineral (hidroxiapatita) durante la mineralización primaria. La mineralización secundaria, que completa el componente mineral, es un proceso físico (crecimiento cristalino) que requiere muchos meses, la resistencia del hueso está directamente relacionada con su contenido mineral. La resistencia completa del hueso lamelar que soporta un implante endóseo no se alcanza hasta aproximadamente 1 año después de la cirugía ^[37].

Hueso compuesto

Es un tejido óseo formado por la deposición de hueso lamelar en la parte inferior de una matriz de hueso reticular, proceso denominado compactación esponjosa. Este proceso es un método rápido de producir un hueso relativamente fuerte en un corto periodo de tiempo. El hueso compuesto es un tipo intermedio e importante de hueso en la respuesta fisiológica a la carga funcional y suele ser el tejido óseo predominante para la estabilización durante el proceso inicial de cicatrización y postoperatoria. Cuando el hueso se forma en la configuración de compactación final, el hueso compuesto resultante de la unión de hueso reticular y lamelar, forma estructuras conocidas como osteonas primarias. A pesar que el hueso compuesto puede ser de alta calidad suele remodelarse a osteonas secundarias ^[37].

Hueso fasciculado

Es una adaptación funcional de la estructura lamelar para permitir la inserción de tendones y ligamentos. Las estriaciones perpendiculares, denominadas fibras de Sharpey, son la principal característica del hueso fasciculado. Suelen verse capas de este tipo de hueso adyacentes al LPO (ligamento periodontal) a lo largo de las superficies formadoras de hueso fisiológico. El hueso fasciculado es el mecanismo de inserción de los ligamentos y los tendones en todo el cuerpo ^[37].

2.2.3 FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO

Factores genéticos

Son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente. Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayores que la amarilla. La

Introducción

masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen ^[32].

Factores mecánicos

La actividad física es indispensable para el correcto desarrollo del hueso. La acción muscular podría transmitir al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Mientras que la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez aceleran el proceso de reabsorción ^[32].

Factores nutricionales

Una dieta baja en calcio puede tener efectos graves en los huesos de la cavidad oral. Por ello, necesitamos una cantidad mínima de calcio, unos 1200 mg diarios hasta los 25 años, hasta los 45 no debe ser inferior a 1 gramo y tras la menopausia por lo menos de 1500 mg al día, para permitir la mineralización ^[32, 37].

Hábitos

El tabaco, la cafeína, el alcohol y el exceso de sal son factores de riesgo para la aparición de osteopenia ^[32]. El consumo de tabaco está relacionado con un deterioro de la revascularización de los injertos óseos y la regeneración ósea ^[44].

Factores hormonales

El sistema endocrino está directamente relacionado con el remodelado óseo. Las hormonas actúan como mensajeros sistémicos a distancia del lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y la acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efecto autocrino y paracrino).

Entre ellas destacan:

- **Hormona tiroidea**: por una parte estimula la síntesis de matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I. Por ello en el hipotiroidismo congénito (cretinismo) se produce talla baja. Por otro lado, estimula la reabsorción al aumentar el número y la función de los osteoclastos así, el hipertiroidismo cursa con pérdida de la masa ósea.

Introducción

- PTH: es la responsable del control de la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Se produce en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, por eso se la considera la hormona hipercalcemiante por excelencia. Posee un papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β . Sin embargo, en los casos en los que se administra de forma continua estimula la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis por parte de las células osteoblásticas, el RANKL. Mientras que a dosis intermitentes estimula la formación de hueso asociado al incremento de los factores de crecimiento y una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.
- Calcitonina: producida por las células parafoliculares del tiroides, es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Esta acción es transitoria ya que los osteoclastos se vuelven impermeables a su acción.
- Calcitriol: hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y con ello la mineralización ósea. También podría ejercer un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos y ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso.
- Andrógenos: tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. También actúan como mediadores en el pico de GH durante la pubertad. Mientras que su déficit está asociado a una menor densidad ósea, la administración de testosterona incrementa la masa ósea.
- Estrógenos: esenciales durante el cierre de cartílagos de conjunción y juegan un papel importante en el desarrollo esquelético. Por un lado, favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos, por otro lado disminuye la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina, proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción, y que podría jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Por eso el descenso de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

Introducción

- Progesterona: anabolizante sobre el hueso directamente a través de los osteoclastos, que poseen receptores para la hormona de forma indirecta por competición de los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides.
- Insulina: estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I.
- Glucocorticoides: a dosis altas tiene efectos catabólicos sobre el hueso por inhibición de la síntesis de IGF-I por los osteoblastos y supresión de la BMP-2 y el Cbfa 1, factores críticos para la osteoblastogénesis. Sin embargo, a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica.
- Hormona de crecimiento (GH): actúa de forma directa sobre los osteoblastos con receptores para la hormona estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina, y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación osteoblástica, aumentando su número y función ^[32, 36, 37, 45].

Patología sistémica

- Diabetes: Afecta al 7% de la población. Se clasifica en diabetes de aparición juvenil (tipo I o insulino dependiente), diabetes del adulto (tipo II o no insulino dependiente) y diabetes gestacional. En la diabetes tipo I el páncreas no produce insulina, mientras que en la de tipo II, más frecuente, se caracteriza por la incapacidad del cuerpo de responder adecuadamente a la acción de la insulina que produce el páncreas. Cuando hay una insuficiencia de insulina la glucosa permanece en el torrente sanguíneo y aumenta el nivel de glucemia. Los pacientes diabéticos son propensos a desarrollar infecciones y complicaciones vasculares. El proceso de curación se ve afectado por alteraciones de la función vascular y de los neutrófilos, así como una menor formación de colágeno tipo I ^[46]. El metabolismo proteico disminuye y se retrasa la cicatrización de los tejidos duros y blandos. También están alterados la angiogénesis y la regeneración nerviosa.

Introducción

- Osteoporosis: es una disminución de la masa ósea que aparece por falta de osificación o por aumento de la resorción ósea. Por lo general aparece en personas de edad avanzada a causa de una disminución en la hormona de crecimiento o en mujeres postmenopáusicas a causa de una disminución en la secreción de estrógenos. Lo que produce una mayor susceptibilidad a las fracturas.

- Enfermedad de Paget u osteítis deformante: enfermedad metabólica que se caracteriza por una reabsorción y deposición de hueso lenta, progresiva e incontrolada. Se desconoce su etiología y suele afectar al reborde alveolar maxilar dos veces más que al mandibular. Radiográficamente se observan una menor radiodensidad, radiotransparencias circunscritas grandes y espacios medulares sustituidos por tejido fibroso. Los huesos del cráneo y las extremidades están engrosados pero son más blandos que los normales. Las concentraciones séricas de la fosfatasa alcalina están elevadas. El calcio puede permanecer normal o elevado y niveles normales de fosfato. Para retrasar la evolución de la enfermedad puede realizarse tratamiento con calcitonina.

- Deficiencia de vitaminas: la deficiencia de vitamina A inhibe la formación y el crecimiento adecuado de los huesos, mientras que su exceso acelera la osificación de los discos epifisarios, lo que da como resultado una estatura baja. La deficiencia de vitamina D, indispensable para la absorción del calcio en el intestino, produce huesos poco calcificados, raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. Su exceso genera resorción ósea. La deficiencia de vitamina C, necesaria para la formación del colágeno, causa escorbuto que puede generar trastornos del crecimiento y la reparación de los huesos ^[31, 47].

2.3 REPARACIÓN ÓSEA

Todo daño tisular provoca unas respuestas naturales del organismo frente a la lesión, encaminada a la reconstrucción del tejido dañado, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales.

La regeneración del tejido óseo puede dividirse en varias fases:

Fase de inflamación

Tras el daño se produce una lesión de las células, vasos sanguíneos y matriz del tejido óseo, así como del periostio o incluso del tejido muscular. Lo que producirá un

Introducción

edema mediante el exudado de líquidos y proteínas plasmáticas. Además se desencadenará la cascada de la coagulación, dirigido por las plaquetas, para controlar la hemorragia en el espacio de la herida.

La fase inicial incluye la formación de fibrina, a partir del fibrinógeno, mediada por trombina y calcio, y la formación de un coágulo formado por plaquetas y hebras de fibrina con enlaces cruzados. Los mismos factores que activan la cascada de la coagulación también activan el sistema fibrinolítico, el cual modula el proceso de coagulación. El sistema del complemento es activado de la misma forma, que produce C5A, quimioatrayente para neutrófilos.

En este coágulo inicial, los productos de degradación producidos por la necrosis celular y factores de crecimiento iniciales, atraen PMN (polimorfonucleares), neutrófilos, linfocitos y monolitos, que se transformarán en macrófagos e inician la fagocitosis de los productos de necrosis.

Fase de granulación

Después de 3-5 días va desapareciendo la red de fibrina y se forma el tejido de granulación [⁴⁸, ⁴⁹, ⁵⁰, ⁵¹, ⁵²] que se mantiene durante 14 días. Se generan nuevos vasos a partir de diversos factores de crecimiento derivados de las plaquetas: PDGF, EGF, TGF- β , IGF y FGF. Se formará una nueva red a partir del colágeno, especialmente colágeno tipo III, y aumenta la proporción de MSCs (células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas). Los macrófagos pasan a ser los principales productores de factores de crecimiento en lugar de las plaquetas, que además de producir PDGF y TGF- β , también expresan otros factores como FGF, VEGF, todos ellos favorecen la angiogénesis, ya que esta es esencial en la osteogénesis como muestran los estudios de Trueta et al. [⁵³].

Fase de proliferación y diferenciación celular

Las células mesenquimáticas pluripotenciales son las responsables de la neoformación ósea. A partir del día 14 disminuiría la angiogénesis y aumenta la migración de MSCs (células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas) y la diferenciación y proliferación de los osteoblastos maduros. Las MSCs acceden al foco de fractura desde el periostio, médula ósea y torrente sanguíneo.

Introducción

El ciclo celular de las células progenitoras sigue 5 etapas de comportamiento:

- Activación: salida del estado quiescente de la MSC por acción de los factores reguladores.
- Proliferación: originada por factores mitogénicos.
- Migración: intervienen diferentes factores reguladores y está influenciado por factores biomecánicos y geométricos de la matriz.
- Diferenciación: progresión en el linaje en el que aparecen las diferencias morfológicas y moleculares específicas del linaje, terminando en la diferenciación celular en donde la célula produce el tejido, que una vez formado va a indicar la maduración de esas células.
- Supervivencia o muerte: la apoptosis o muerte es una forma de diferenciación celular.

Además, los osteoblastos no pueden multiplicarse por lo que se dependerá por completo de las MSCs para los procesos de reparación del hueso. Los TGF, PGE, IGF y BMP de la matriz extracelular actúan sobre las MSCs, mientras que las MSCs producen TGF, IGF y BMP, que de manera autocrina, favorecen la diferenciación a osteoblastos y de manera paracrina la producción de proteínas óseas por parte de los osteoblastos.

El TGF, a su vez, activa la diferenciación de los fibroblastos y la movilización de las células mesenquimales al foco de fractura e inhibe la actividad osteoclástica, así como la formación de osteoclastos para limitar la reabsorción de hueso en el foco de fractura. La diferenciación de los osteoclastos a partir de los macrófagos inicia la reabsorción del hueso necrótico producido tras el trauma inicial.

La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Posteriormente el tejido fibroso se transforma en fibrocartílago, con un importante contenido de colágeno tipo II, proteoglicanos específicos y proteínas de unión.

Fase de formación ósea

El tejido óseo inicial es el tejido osteoide o matriz extracelular no mineralizada donde predomina el colágeno tipo I y los osteoblastos van quedando incluidos formando osteocitos. El osteoide es mineralizado por pequeños cristales de hidroxiapatita, formando el hueso inmaduro reticular (2°-6° semana) ^[54], lo que formara “el callo blando”. Después se inicia un proceso de mineralizado y compactación laminar alrededor de un vaso sanguíneo, formándose una osteona primaria formada por hueso inmaduro de fibras paralelas (6°-18° semana), que pasa por un proceso de remodelado (18°-54° semana) para pasar a una osteona secundaria formada por hueso laminar o Haversiano ^[50, 51]. Finalmente, se produce la mineralización de la matriz ósea en paralelo a un aumento de la concentración de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas, proceso que concluye con la osificación de la masa fusiforme del callo que envuelve los extremos fracturarios y que contiene cantidades crecientes de hueso inmaduro.

Una vez que se ha reemplazado todo el hueso neoformado, el proceso de remodelación continúa con la reabsorción de las trabéculas mal orientadas por parte de los osteoclastos y su sustitución por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza. Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido ^[55, 56].

3. ESTRATEGIAS ACTUALES PARA REGENERACIÓN LOS TEJIDOS ÓSEOS

Cuando se produce un daño tisular, la capacidad de regeneración en ocasiones está limitada. Por ello es importante distinguir entre el término regeneración y reparación. En la reparación la restauración de dicho tejido no conserva su arquitectura original ni su función, por lo que sus propiedades físicas y mecánicas son inferiores a las del tejido original. Está es una transformación que en general ocurre de manera espontánea siendo el resultado de la cicatrización ^[28]. Actualmente se está desarrollando la ingeniería de tejidos, cuyo objetivo es la regeneración, logrando la restauración del tejido con las mismas propiedades que las del original.

Introducción

Los defectos del tejido óseo pueden regenerar de forma espontánea (autocicatrizante), como son los alveolos post-extracción en caso de corticales gruesas. O bien, no pueden regenerar por si solos (no autocicatrizante), al ser el defecto óseo de un tamaño crítico. En este caso el hueso no es capaz de devolver la anatomía original ni la función, la osificación es parcial y el hueso crece menos que el tejido tisular ^[57, 58]. Esto es debido a que las células conectivas tienen una velocidad de proliferación superior (0,5 mm diarios) a las células óseas (50 μ m al día) ^[33], además las células conectivas acudirán en primer lugar a la zona del defecto, impidiendo el crecimiento óseo. Para evitar este fenómeno, puede resultar eficaz interponer una barrera física que impida la invasión celular desde el tejido conectivo. El uso de determinados materiales que actúen de barrera hace que este tejido no colapse el defecto y permita el crecimiento del hueso que es más lento. El mantenimiento del espacio puede lograrse con el uso de membranas, pero estas pueden invaginarse reduciendo el espacio para la regeneración del hueso, el uso de un material de injerto reabsorbible podría cumplir también esta función de barrera. Sin embargo, hay que tener en cuenta el tiempo de reabsorción del material, que cumple un papel fundamental, ya que si este se reabsorbe demasiado rápido, en comparación con la formación de hueso, la zona se rellenará con tejido conjuntivo ^[33, 59, 60].

Existen cuatro mecanismos relacionados con el éxito de la regeneración ósea. El sustituto óseo ideal cumple todas estas características:

- Osteointegración: es la capacidad del biomaterial de unirse químicamente al hueso sin formar una capa intermedia de tejido fibroso.
- Osteoconducción: es la capacidad de proporcionar la estructura o matriz física apropiada para favorecer el crecimiento del tejido óseo del propio individuo, actuando a modo de guía.
- Osteoinducción: es la capacidad de inducir la diferenciación de células troncales pluripotentes hacia osteoblastos, mediante factores estimulantes locales que facilitan la diferenciación celular como las BMP.
- Osteogénesis: es la capacidad que poseen las células osteogénicas vivas de establecer centros de osificación.

Introducción

Actualmente las principales estrategias de las que disponemos para reparar los tejidos óseos son, la regeneración ósea guiada, la osteodistracción, los injertos, los biomateriales y la ingeniería tisular, que explicaremos a continuación con más detalle [28, 61, 62, 63, 64, 65, 66].

La **regeneración ósea guiada** u osteopromoción fue introducida por Nyman y Gottlow en 1982 ^[67]. Es un concepto nuevo que se ha incorporado a los procesos reparativos en la última década. La regeneración ósea guiada consiste en el uso de materiales de barrera para conseguir la cicatrización de un área definida adyacente a una superficie ósea, únicamente mediante hueso, impidiendo la invasión del defecto óseo por células de tejidos competitivos no osteogénicos. De esta forma la revascularización del defecto proviene del lecho receptor, e impide la llegada de capilares del conectivo de las zonas adyacentes (Tabla 1 y 2). Debido a sus características físicas y biológicas el material barrera más usado en implantología son las membranas. De acuerdo a su capacidad de reabsorción las membranas se dividen en reabsorbibles y no reabsorbibles, que pueden utilizarse con o sin materiales de relleno.

Las membranas se clasifican en 2 grandes grupos:

- **Membranas no reabsorbibles**: que permiten el modelado evitando el colapso y creando el espacio deseado para que se rellene de tejido óseo. El principal inconveniente es que requieren de una segunda intervención para su retirada. Existen distintos tipos: polímeros no reabsorbibles, membranas de etil-celulosa, mallas de titanio y actualmente las más empleadas son estructuras semirrígidas de colágeno con refuerzo de titanio. Este tipo de barreras soportan mejor las cargas evitando que se colapse el espacio a regenerar (Tabla 1).

- **Membranas reabsorbibles**: No necesitarán una segunda cirugía para su retirada puesto que se reabsorben de forma espontánea mediante mecanismos de fagocitosis o hidrólisis. Su origen puede ser sintético como el ácido poliláctico y/o ácido poliglicólico, este tipo de barreras mantienen su integridad durante más de 8 o 10 semanas antes de empezar a reabsorberse. Su completa reabsorción es aproximadamente a los 6 meses. El otro grupo las componen las membranas de origen natural como las de colágeno (Tabla 2). Como norma general todas las membranas deben permanecer como mínimo 4 semanas intactas para asegurar la formación de hueso.

Tabla 1: Barreras no reabsorbibles empleadas en odontología ^[28].

Barreras no reabsorbibles	Nombre comercial
Politetrafluoretileno expandido (PTFE)	Gore-tex®
Politetrafluoretileno expandido con refuerzo de titanio	
Politetrafluoretileno expandido de alta densidad con poros nanométricos (NPTEF)	Teflón®
Micromallas y membranas de titanio, vanadio, ...	

Las membranas de colágeno son las más utilizadas actualmente, debido a sus características de biocompatibilidad, actúan como barrera, son quimiotácticas y reabsorbibles. Pero como todas las barreras, presentan características hemostáticas que deberemos tener en cuenta a la hora de su colocación, ya que la revascularización del defecto proviene del lecho receptor e impide la llegada de capilares del conectivo de zonas adyacentes ^[28, 59, 60, 68]. Uno de los principales inconvenientes de la regeneración ósea guiada es el riesgo a la exposición y contaminación de la membrana con las consecuencias negativas que esto conlleva. Además, es imprescindible estabilizar la membrana mediante tornillos de titanio o sutura, para evitar que se desplace y cubra perfectamente el defecto a regenerar ^[69].

Tabla 2: Barreras reabsorbibles más comunes en odontología ^[28].

Barreras reabsorbibles	Nombre comercial
Hueso cortical desmineralizado	Lambone®
Colágeno	Bio-Guide®, BioMend®
Poliglactina 910	Vicyl®
Polímeros láctico y/o glicólico puros	Resolut®, Atrisorb®, Epi-Guide®
Sulfato cálcico mezclado con PRGF	Bone-Mousse, tipo I®
Fosfato tricálcico mezclado con PRGF	Bone-Mousse, tipo II®

La **osteodistracción**, mas empleado en el ámbito de la traumatología, ha ido abriéndose paso en el campo de la cirugía oral y maxilofacial. Consiste en la creación de hueso mediante una fractura, al ir separando los fragmentos de forma controlada mediante osteodistractores. Estos constan de dos miniplacas que se activan con un tornillo, la finalidad es separar ambas partes, estirando el coágulo de fibrina que se forma entre ellos, creando un puente óseo entre ambos fragmentos. Para ello los extremos de la fractura deben estar estables para que no se rompa el puente de fibrina ^[28].

Los **injertos** lo componen fragmentos de tejido viable o un conjunto de células viables, que se transfieren del lugar donante al lugar de recepción, y cuyo propósito es la reconstrucción del lugar a reparar.

Introducción

Atendiendo a su origen podemos clasificarlos como:

- Autoinjerto, hueso autólogo u autógeno: es considerado el “gold standar” de los injertos, ya que es el único material que es osteogénico, osteoinductor y osteoconductor. El componente celular constará de las células que sobreviven al trasplante, osteoblastos maduros y un número más alto de células precursoras, presentes principalmente en el hueso esponjoso, que son las que aportan el potencial osteogénico al injerto óseo autógeno. Este tipo de injerto procede del propio paciente, en el cual se selecciona una zona donante y se trasplanta a la zona receptora donde es necesario. Por ello, es el injerto con mejores propiedades óseas, aunque no es el que mejor se comporta, debido a los procesos de reabsorción que puede sufrir, hasta un 30% en los primeros 36 meses.

Las zonas donantes para injertos en la cavidad oral pueden ser extraorales como calota, tibia, cresta iliaca, costilla; o intraorales como el ángulo de la mandíbula, la zona del mentón, rama ascendente de la mandíbula o la tuberosidad. Es preferible que tengan el mismo origen embriológico, ya que su reabsorción será menor. Por ello, en el campo de la odontología se preferirán los injertos intraorales o de calota, ya que tienen el mismo origen membranoso, mientras que el de cresta iliaca, de origen endocondral, sufrirá una mayor reabsorción. Uno de los principales problemas de este tipo de injertos es la reabsorción que presentan tras el remodelado, así los injertos de cresta iliaca o los costales mantendrán el reborde alveolar durante un corto periodo de tiempo, entre 1-3 años, y el proceso de resorción será similar al que experimentaba el reborde óseo original. Los injertos pueden obtenerse en forma de chips de hueso o en bloque, dependiendo si se trata de un hueso principalmente esponjoso o cortical, así como del defecto a rellenar.

Este tipo de injertos plantean el inconveniente de la morbilidad que sufre el paciente, así como unos tiempos quirúrgicos mayores o la limitación en la cantidad de injerto que disponemos, por lo que el propio paciente en muchas ocasiones no desea someterse a dichas intervenciones. También influirán en el éxito del tratamiento la manipulación y colocación del injerto en el lecho receptor, y la habilidad y experiencia quirúrgica del cirujano, que influirá en la capacidad osteogénica del injerto [28, 70, 71, 72, 73,

74].

Introducción

- Aloinjerto, hueso homólogo o alógeno: son aquellos injertos en el que el donante es otro individuo de la misma especie, pero con distinto genotipo. Su principal fuente son los bancos de hueso humano. Existen tres tipos: hueso fresco congelado, liofilizado (Freeze-dried bone allograft; FDBA) y descalcificado (Decalcified freeze dried bone allograft; DFDBA). Los injertos con DFDBA, según diferentes estudios, originan un hueso inmaduro al cabo de 6 meses, mientras que el injerto de FDBA origina un hueso compacto. Hoy en día el más utilizado es el hueso liofilizado desmineralizado (DFDBA) que elimina la fase mineral dejando la matriz ósea intacta. Proceden de un banco de hueso de cadáver desmineralizado, esterilizado y congelado, con lo cual mantienen la capacidad conductora pero no la osteogénica, ya que carecen de células vivas. Este tipo de injertos desechan la morbilidad que sufría el paciente, ya que se elimina la cirugía de la zona donante. Pero el clínico necesitará bastante tiempo y experiencia para poder adaptarlo al defecto. Puede existir el riesgo de transmisión de enfermedades víricas como Hepatitis B y C y VIH, aunque esta es prácticamente nula [28, 33, 75, 76].

- Xenoinjerto, hueso heterólogo o xenógeno: en el que donante proviene de otra especie distinta al receptor, están los de origen animal: bovino, equino y porcino; y los coralinos.

El más común de todos es el bovino (Bio-Oss®), durante el proceso de fabricación es sometido a un proceso de desproteinización y esterilización. Este proceso elimina la matriz orgánica sin alterar los microtúneles existentes entre los cristales de apatita. Está compuesto por una apatita carbonatada deficiente en calcio que presenta propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales muy parecidas al hueso humano, por lo que obtendremos una matriz mineral remanente con cristales de aproximadamente 100 µm de diámetro. Ha sido uno de los injertos más utilizados en el campo de la cirugía oral. La función principal de este material, es la de ocupar el espacio del defecto, ya que solo poseen capacidad osteoconductora. Otra de sus características es que casi la totalidad de ellos presentan lenta o nula reabsorción, al ser insoluble en fluidos orgánicos, es decir, carecen de recambio por hueso nativo. Puede tener diferentes presentaciones (polvo, esponja, malla y fieltro). La aparición de la encefalopatía espongiiforme bovina en el Reino Unido y, posteriormente en 1996, la detección del síndrome de Creutzfeldt-Jakob en humanos, que se relacionó con esta

Introducción

patología bovina, ha llevado a plantear dudas sobre la posible transmisión de priones en los procedimientos regenerativos [33, 71, 77, 78].

Otra alternativa es el coral marino de las especies porites y goniopora, que posee una estructura permeable similar a la del hueso esponjoso. En 1974 Roy y Linnehan describieron la obtención de hidroxiapatita desde el esqueleto carbonatado de algunos géneros de coral por medio de un proceso de intercambio hidrotermal [79]. El carbonato cálcico del coral se trata para quitar la mayoría del material orgánico y se expone posteriormente, a presión y calor extremos en solución acuosa de fosfato para lograr una HA esterilizada. El tamaño de poro mínimo para el crecimiento óseo oscila entre 45-100 μm , el crecimiento fibrovascular se acelera si el tamaño de poro está entre 100-150 μm [80]. La ventaja principal de este material es la estructura porosa que permite el crecimiento del tejido fibro-óseo en su interior a través de los poros. Para su empleo clínico se dispone de una presentación que se obtiene de especies del género porites porites, que tiene un tamaño de poros entre 190 y 230 μm y que ofrece un diseño adecuado para matrices de reconstrucción del hueso cortical, y otra que se consigue de la duplicación de porites goniopora que presenta poros de 500 μm y que se reserva para la sustitución del hueso esponjoso. El crecimiento fibro-óseo dentro de la HA mejora las propiedades mecánicas y plásticas pero no alcanza la dureza del hueso trabecular [33, 34, 81, 82].

El **material aloplástico o biomaterial** son materiales destinados a interactuar con los sistemas biológicos, para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo. La finalidad de éstos es favorecer la osteoconducción y servir de estructura o de molde para facilitar la osteogénesis. Se pueden clasificar atendiendo a su origen, en naturales o artificiales; o a la naturaleza del material con el que se fabrica en metálicos, poliméricos, cerámicos o materiales compuestos. Además todos ellos pueden ser a su vez, reabsorbibles o no reabsorbibles. El grado y rapidez de reabsorción está en relación con diversos factores que iremos viendo a lo largo del desarrollo de esta tesis, dando lugar a productos no tóxicos y que pueden ser eliminados o metabolizados por el organismo.

La **ingeniería tisular** nace como opción para restaurar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido, a partir de la manipulación de las matrices tridimensionales (scaffolds), las células y los factores de crecimiento y diferenciación.

Las matrices tridimensionales proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación y mantenimiento de sus funciones diferenciadas y las señales biológicas para la conservación de la expresión génica. Además definen la arquitectura del tejido.

Las células empleadas para la ingeniería tisular deben ser fáciles de obtener y de expandir, conservar el fenotipo, mantener su función y ser multipotenciales para diferenciarse a una variedad de células especializadas. Por ello la obtención de células madre mesenquimales ha despertado un gran interés, ya que se pueden replicar como células indiferenciadas que tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes linajes de tejido. Se obtienen a partir de tejido adiposo o médula ósea.

Y por último los factores de crecimiento que son moléculas de señalización que pueden actuar como mitógenos, que regulan la diferenciación y proliferación celular o como morfógenos induciendo el cambio en el fenotipo de las células blanco. Algunos de los más conocidos son: BMP, IGF, TGF- β , PDGF, FGF. Estos se obtienen a partir del plasma rico en plaquetas.

El objetivo es cultivar estas células en matrices tridimensionales biodegradables altamente porosas, tratadas con moléculas de señalización, que al ser implantadas en el defecto deben inducir y dirigir el crecimiento del nuevo tejido. Las células adheridas a la matriz deben proliferar, diferenciarse y organizarse en tejido normal, mientras que la matriz se metaboliza o degrada. Dependiendo de la necesidad pueden inyectarse directamente las células o las moléculas de señalización en el sitio del defecto, sin las matrices, cuando el tejido está confinado a una pequeña región ^[83, 84].

3.1 **PROPIEDADES DE LOS BIOMATERIALES**

Biocompatibilidad: capacidad del material de proporcionar una respuesta apropiada por parte del huésped para su aplicación específica, caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e

Introducción

incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos o tóxicos (genotóxicos o citotóxicos) sobre tejidos distantes y la ausencia de respuesta inmune.

Porosidad: es indispensable para la difusión de nutrientes y gases y la remoción de desechos metabólicos como resultado de la actividad celular, procesos fundamentales en el hueso debido a sus características metabólicas ^[85]. Los poros deben estar abiertos al exterior e interconectados. El tamaño ideal varía entre 200-900 μm ^[86].

Propiedades de superficie: tanto las propiedades químicas como las topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular ^[87]. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, que es el proceso mediante el cual las células osteogénicas migran a la superficie de la matriz tridimensional a través de un coagulo de fibrina que se establece una vez implantado el material ^[88].

Osteoinductividad: es el proceso mediante el cual las células madre son reclutadas y estimuladas para diferenciarse hacia la línea osteogénica ^[85].

Propiedades mecánicas y físicas: depende del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se será sometido. Adquiriendo una especial importancia la fuerza de tensión, la resistencia a la fractura, la elongación a la fractura, la resistencia a la fatiga y el módulo de Young. Como propiedades físicas, serán importantes la densidad y la expansión térmica en el caso de los cementos óseos. Y la superficie química debe ofrecer resistencia a la degradación, oxidación, corrosión así como una capacidad de interacción del hueso óptima ^[10].

Biodegradabilidad: Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de resorción que igualen a las de formación ósea, de tal manera que cuando la lesión está totalmente regenerada la matriz se halla degradada totalmente ^[85, 89].

3.2 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES

Los sustitutos sintéticos de los que disponemos actualmente son en orden de biofuncionalidad y biocompatibilidad (Figura 5):

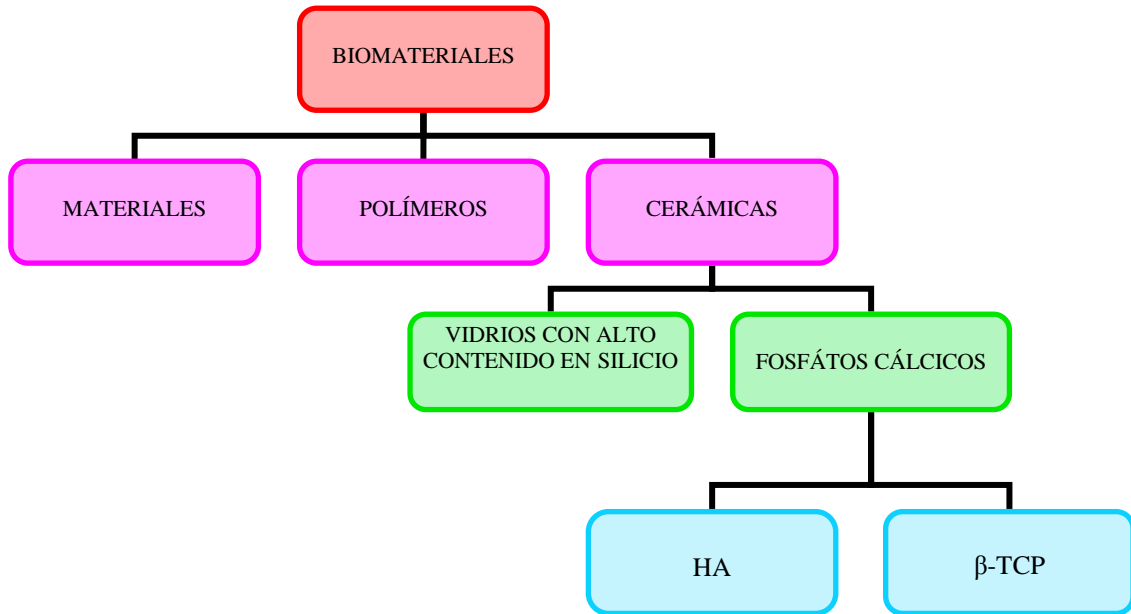


Figura 5: Esquema de los principales biomateriales sintéticos.

Metales: (titanio, aleaciones de titanio, acero inoxidable, y aleaciones de cromo-cobalto). Algunas de sus propiedades para su utilización en implantes es su tolerancia por parte del organismo y buena resistencia a la corrosión, especialmente cuando se encuentran en un medio como el organismo humano a una temperatura aproximada de 37° C. Los metales preciosos se escapan al problema de la corrosión, sin embargo otro tipo de metales como el titanio, forman como respuesta a la corrosión una capa de dióxido en su superficie y la pasivan, protegiendo el interior del metal y evitando así el avance de la corrosión. Este tipo de material se utiliza con éxito en diversos implantes, en particular cuando es necesario soportar grandes cargas. Sin embargo, aunque las propiedades mecánicas de los metales sean superiores, no ofrecen una elevada capacidad de interacción con el hueso a diferencia de otros materiales como los fosfatos cálcicos [83, 90].

Cerámicas: (fosfatos cálcicos y cerámicas de vidrio). Nos proporcionan una buena osteointegración, biocompatibilidad y baja reactividad química. Son materiales similares al hueso de tal manera que después de cierto tiempo, el organismo no llega a distinguir la procedencia del lugar sustituido. De este tipo de materiales hablaremos más ampliamente a continuación [11, 83].

Polímeros: (silicona, poli-metil-metacrilato, poli-láctico, poli-uretano y poli-etileno de alto peso molecular). Ampliamente utilizados en clínica, deben su éxito a las enormes posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos, como en la posibilidad de fabricarlos de muy distintas maneras, con características bien determinadas, y con facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, partículas o bloques. Pueden ser tanto naturales como sintéticos, bioestables o biodegradables. Su aplicación va desde implantes quirúrgicos a membranas protectoras o sistemas de dosificación de fármacos. Alguno de los problemas que presentan es el calor que desprenden durante su polimerización. Los polímeros sintéticos absorbibles más utilizados son el ácido poliglicólico y poli-láctico y sus copolímeros. Aunque pueden crearse con una estructura porosa conductiva, su potencial osteoconductor es por el momento limitado. En la actualidad, a nivel de investigación, se trabaja con estos materiales como armazones embebidos en células madre o en factores de crecimiento para generar hueso, o bien junto a cerámicas como sustitutos óseos [83, 91, 92].

Composites: son implantes metálicos con una capa de cerámica, o polímeros reforzados con cerámica [83].

3.2.1 BIOMATERIALES CERÁMICOS

El primer material cerámico que se empleó como sustituto óseo en clínica fue el sulfato de calcio hemihidratado, conocido comúnmente como yeso de París. En 1892, Dreesman usa este material mezclado con una solución de fenol al 5.0% para rellenar cavidades de huesos largos en 8 pacientes [93]. Pero la mayor parte de los biomateriales cerámicos se introducen en la década de los años 70 en la que comenzaban a detectarse fracasos en los biomateriales utilizados hasta el momento, como eran el acero, aleaciones de cobalto y poli-metil-metacrilato. El fracaso se debía principalmente a la encapsulación de estos materiales, por lo que se decidió dirigir la mirada hacia las cerámicas en busca de una buena osteointegración. Sin embargo, su fragilidad restringía

Introducción

mucho su campo de aplicación, ya que hay que elegir funciones que no requieran elevadas prestaciones mecánicas. Inicialmente el interés se centró en cerámicas biológicamente inertes como son la alúmina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) y la zirconia (ZrO_2), debido a su excelente resistencia a la corrosión, alta resistencia mecánica y bajos coeficientes de fricción y desgaste. La principal ventaja de este tipo de materiales es su baja reactividad química, lo que las hace prácticamente inertes y por tanto biocompatibles. Posteriormente, fueron las cerámicas bioactivas las que fueron captando la atención, Hulbert las describió como: “el material que posibilita una respuesta biológica específica en su interfaz, de manera que favorece la formación de un enlace entre los tejidos y dicho material”. Por lo que pueden enlazarse al tejido óseo vivo y en contacto con los fluidos fisiológicos reaccionar químicamente en dirección de producir hueso neoformado. Para lograr el éxito clínico con un material bioactivo es necesario que simultáneamente se forme una interfaz estable con el tejido conectivo, y que el comportamiento mecánico sea semejante al del tejido a reemplazar. Las biocerámicas permiten fabricar biomateriales con una buena biocompatibilidad y osteointegración, además son materiales muy parecidos al componente mineral del hueso. Se caracterizan por ser osteoconductores, poderse esterilizar y reducir la morbilidad del paciente ^[11, 94].

Podemos clasificar los materiales cerámicos de la siguiente manera:

Biovidrios con alto contenido en silicio

Descritos en los años 70 por Helch et al. están compuestos por óxido de sodio, óxido de calcio, pentóxido de fósforo y dióxido de silicio. Al contactar con un medio acuoso fisiológico, se forma una capa de gel de sílice en la superficie del vidrio bioactivo. Los iones de calcio y fosfato presentes en el gel se precipitan en cristales de hidroxiapatita, similares a los del hueso, formando un enlace químico y fuerte con el hueso ^[95]. El calcio y los iones de sílice se liberan progresivamente e interactúan con las células circundantes, permitiendo la colonización por células indiferenciadas con potencial osteogénico, dando lugar a la formación de múltiples focos de hueso nuevo. La superficie externa podría formar una capa amorfa de calcio y fosfato que se une a proteínas, colágeno, fibrina y factores de crecimiento. Este material se reabsorbería gradualmente y al igual que el fosfato cálcico no ofrece un soporte estructural en la cirugía ósea. La fuerza mecánica del vidrio bioactivo es superior a la de los fosfatos

Introducción

cálcicos como la hidroxiapatita cerámica y aunque el material se puede perforar y moldear, estos procesos conllevan el riesgo de su ruptura ^[66, 96].

Clínicamente, el vidrio bioactivo se ha utilizado para aumentar el volumen del injerto autógeno y como sustituto óseo en la cirugía maxilofacial, únicamente posee una acción osteoconductora. Su uso en forma granulada como relleno óseo en zonas sin carga mecánica, no ha resultado superior al uso de otros materiales de relleno óseo. Es aconsejable no compactarlo en exceso, a fin de dejar espacio entre las partículas, ya que es un material no poroso y poco o nada reabsorbible. Sin embargo, las partículas del vidrio bioactivo se reabsorben más rápido que las de HA ^[12, 83].

Fosfatos cálcicos

Las cerámicas se obtienen mediante temperaturas muy altas a más de 1000° C. Algunas de las ventajas de este tipo de materiales son su porosidad del 35% con poros interconectados, o su capacidad química para que las células óseas depositen el nuevo hueso directamente sobre la cerámica. Su composición es muy parecida a la del hueso mineral. La osteointegración se debe a la precipitación de iones de calcio y fosfato derivados del material y el hueso, y la formación de una capa de apatita.

Dentro de los fosfatos de calcio hay que distinguir los metafosfatos, que contienen grupos PO_3^{3-} , los pirofosfatos con grupos $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$ y los ortofosfatos que contienen grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$. Sin embargo, en principio para aplicaciones biomédicas sólo son de interés los ortofosfatos, ya que los pirofosfatos y los metafosfatos se hidrolizan, convirtiéndose en ortofosfatos en contacto con los fluidos fisiológicos. Los principales ortofosfatos cálcicos se exponen en la Tabla 3, con una relación molar calcio/fósforo que varía entre 0,5 y 2 ^[97, 98].

Existen fosfatos de calcio que pueden obtenerse por precipitación, a partir de una solución sobresaturada de fosfatos de calcio, a una cierta temperatura. Sin embargo, otros fosfatos sólo pueden obtenerse por sinterización en estado sólido a alta temperatura. Los primeros, pertenecen al sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$, solo un número limitado de fosfatos cálcicos se pueden preparar vía precipitación de una fase sólida cristalina con una estequiometría, propiedades físicas y termodinámicas bien definidas. El interés en el campo biomédico se enfoca en el fosfato monocálcico

Introducción

monohidratado (MCPM), el fosfato monocálcico anhidro (MCPA), el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), el fosfato octacálcico (OCP) y la hidroxiapatita precipitada (PHA). Los segundos, pertenecen al sistema ternario de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ y se obtienen mediante reacción en estado sólido a altas temperaturas. Entre ellos encontramos al fosfato tricálcico beta (β -TCP), fosfato tricálcico alfa (α -TCP), hidroxiapatita cerámica (HA) y fosfato tetracálcico (TTCP). El incremento de la reacción Ca/P está asociado a un aumento en la alcalinidad de la sal ^[99].

Las cerámicas de fosfato cálcicos, principalmente el β -TCP y la hidroxiapatita, han generado mucho interés para su uso en la restauración del tejido óseo. Sin embargo, la incapacidad de moldearlos *in situ* (en el quirófano) limita su uso a formas en bloque o granulado, lo que supone el riesgo de migración del injerto lejos del defecto óseo por la falta de una integración mecánica ^[100]. A continuación se explican con más detalle ambas cerámicas:

- Fosfato tricálcico beta (β -TCP): es uno de los primeros compuestos de fosfato cálcico utilizado como sustituto óseo, existiendo referencia desde 1920 por Albee y Morsion. Este material puede presentarse de forma sólida en bloque o granulado. Su fuerza de tensión y de compresión es similar a la del hueso esponjoso. Es un material débil frente a las fuerzas de cizalla y de tensión pero resistente a la compresión ^[101]. Su reabsorción ocurre por la disolución y fragmentación a los 6-18 meses y la cantidad de hueso formado es menor que la de material reabsorbido ^[102].

- Hidroxiapatita sintética (HA): la hidroxiapatita es el mineral principal del hueso, puede ser cerámica o no cerámica. Cuando hablamos de la de tipo cerámica es porque los cristales de HA se han sometido a temperaturas entre 700-1300° C para formar estructuras altamente cristalinas. Es bastante resistente a la reabsorción *in vivo* en torno al 1-2% por año ^[103], siendo su tasa de reabsorción más baja que la del β -TCP ^[10], por lo que no permite el crecimiento fibro-óseo dentro del material. Sin embargo, la HA no cerámica, que prepara mediante una reacción de fraguado de un cemento de fosfato cálcico, es bastante más reabsorbible *in vivo* ^[33, 66, 104, 105]. Esta cerámica es resistente a las fuerzas de compresión pero débil frente a la tensión y el cizallamiento y tiene un módulo elástico mayor que el del hueso ^[106, 107].

Tabla 3: *Ortofosfatos de calcio que pueden formar parte de los reactivos de cementos de fosfato cálcico* ^[13].

Ca/P	Compuesto	Símbolo	Fórmula
0,5	Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,5	Fosfato monocálcico	MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1,0	Fosfato dicálcico anhidro o monetita	DCP	CaHPO_4
1,0	Fosfato dicálcico dihidratado o brushita	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,33	Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,35-1,5	Fosfato de calcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1,5	Fosfato tricálcico β	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	Fosfato tricálcico α	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5-1,67	Hidroxiapatita precipitada	PHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$
1,67	Hidroxiapatita sinterizada	SHA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,67	Oxiapatita	OXA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$
1,69	Apatita carbonatada	CAP	$\text{Ca}_{8,8}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{PO}_4)_{4,5}(\text{CO}_3)_{0,7}(\text{OH})_{1,3}$
2,0	Fosfato tetracálcico	TTCP o TetCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

- Fosfato cálcico bifásico: está compuesto por HA y β -TCP en proporción variable y sometidos a temperaturas superiores a 900° C, su grado de reabsorción va asociado al porcentaje de β -TCP que exista en su composición, puesto que el β -TCP es más biodegradable que la HA ^[103]. Su relación Ca/P oscila entre 1,5 y 1,67 ^[108, 109].

3.2.2 CEMENTOS DE FOSFATO CÁLCICO (CFC)

Los problemas asociados a las cerámicas residen en la imposibilidad de obtener la forma y tamaño necesarios según la aplicación clínica en el momento de la intervención, y por lo tanto se disponen en formas prefabricadas para ser utilizados como gránulos o bloques, con el consiguiente problema de desplazamiento dentro y fuera de la cavidad. En 1982, LeGeros postula el concepto de los cementos basados en fosfatos de calcio, que fue concretado por Brown y Chow en 1983 ^[14] al publicar el primer estudio sobre un cemento óseo que fragua a temperatura fisiológica y suponía la posibilidad de obtener HA en forma monolítica. El cemento se obtenía al mezclar dos sales de fosfato cálcico, concretamente una fase básica el fosfato teracálcico y una fase ácida, el fosfato dicálcico dihidratado o el hidrogenofosfato de calcio, con una solución acuosa, como resultado se consiguió una pasta que fraguaba a temperatura ambiente. Este biomaterial era capaz de ser bioactivo, moldeable e inyectable y fraguar *in vivo* dentro de la cavidad oral. En general se puede decir que los CFC están formados por la combinación de una fase sólida de uno o más ortofosfatos cálcicos, y una fase líquida una solución acuosa o agua, al mezclarlas forman una pasta plástica que fraguará a temperatura ambiente, siendo capaz de endurecerse después de ser implantada dentro del cuerpo. Esta pasta pierde sus características viscoelásticas durante el fraguado y endurece con el tiempo hasta llegar a la saturación ^[13].

En la vida de un cemento se pueden definir tres periodos: un periodo inicial o de fraguado, un periodo de endurecimiento y un periodo de envejecimiento (Figura 6). El periodo de fraguado (transición de pasta plástica a pasta espesa) muestra el tiempo de cohesión de la pasta bajo inmersión en una solución acuosa, así como el tiempo inicial y final de fraguado, respectivamente. El periodo de endurecimiento (transición de pasta espesa a masa sólida) comprende el fraguado total de la pasta de cemento a una masa sólida endurecida, y suele caracterizarse a través de propiedades mecánicas de la pasta tales como la resistencia a la compresión.

El fraguado del cemento es el resultado de un proceso de disolución de los reactivos y precipitación de una nueva fase, que tiene lugar a temperatura ambiente o corporal. El entrelazamiento entre los cristales precipitados es responsable del fraguado y endurecimiento del cemento. Los CFC se producen mediante dos tipos de reacción de fraguado. La primera ocurre de acuerdo con una reacción ácido-base; una fase de

Introducción

fosfato cálcico relativamente ácida reacciona con otra relativamente alcalina produciendo una fase de fosfato cálcico neutra. La segunda reacción de fraguado se produce cuando el fosfato cálcico inicial y el producto final de la reacción de fraguado comparten la misma relación molar Ca/P.

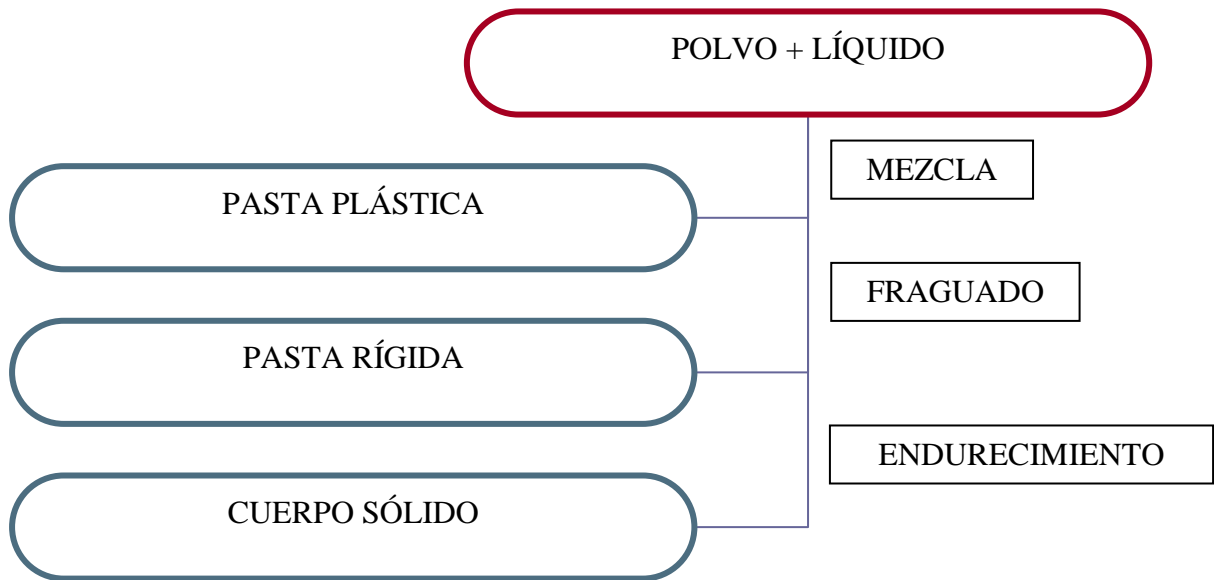


Figura 6: esquema de la formación de un CFC ^[13].

Los CPC presentan una estructura microporosa después del fraguado, con porosidades bastante elevadas que pueden variar del 30 al 50%, dependiendo de diversos factores de procesamiento como la relación polvo-líquido utilizada. Las propiedades de fraguado y endurecimiento de un cemento pueden ajustarse modificando distintas variables de procesamiento, como la composición química de los reactivos y el tamaño de la partícula, por lo que este tipo de material es muy versátil y se puede adaptar a distintos requisitos clínicos para diversas aplicaciones. Además los cementos de fosfatos de calcio tienen la propiedad de activar las funciones osteoclásticas y osteoblásticas propias de un proceso de regeneración ósea, con la ventaja añadida de que estas funciones actúan sobre el mismo material transformándolo con el tiempo en una estructura organizada característica de un hueso neoformado. Los cementos de apatita son reabsorbidos mayoritariamente por procesos de reabsorción activa, mediados por la actividad celular. Las células osteoclásticas degradan el material capa a capa, comenzando por las superficies externas hasta el interior ^[12, 13].

El desarrollo de los CPC abrió grandes expectativas, debido a la posibilidad de utilizar un material moldeable, que se adaptaba perfectamente al defecto óseo y capaz una vez instalado de fraguar a temperatura ambiente, además de incorporar las ventajas de los fosfatos cálcicos. Estas ventajas son enormes ya que el cirujano dispone de las propiedades de moldeabilidad, inyectabilidad ^[110] y de adaptación completa a la cavidad que le proporciona el material, *in situ*, en el lugar de operación.

Los CFC incorporan una gran ventaja frente a las cerámicas para la liberación de drogas de forma prolongada, puesto que los medicamentos pueden incorporarse en todo el espesor del cemento, añadiéndose a una de sus fases, y no solo en su superficie. Además al fraguar a temperatura ambiente no producirán la descomposición del fármaco. Es importante primero verificar que al añadir la droga no interferimos con la reacción de fraguado, modificando las propiedades físico-químicas. Y en segundo lugar es necesario caracterizar la cinética de la liberación de la droga *in vitro*. También ha surgido el interés por introducir sustancias capaces de estimular la regeneración ósea del hueso y favorecer el potencial regenerador de los cementos de fosfato cálcico como son los factores de crecimiento teniendo una especial importancia BMP ^[13].

Desde el hallazgo de los CFC se han ido desarrollado distintas formulaciones para su obtención. En general los cementos de fosfato cálcico surgen de la combinación de diversos ortofosfatos de calcio con distintos grados de acidez o basicidad. Los ortofosfatos que pueden formar parte de los reactivos de los cementos de fosfato cálcico se describen en la Tabla 3, que pueden ser utilizados como reactivos de los CFC. Dependiendo de los componentes que utilicemos obtendremos distintos productos finales (Tabla 4) ^[13]. En la mayor parte de los cementos de fosfato cálcico, el producto final de la reacción de fraguado es una fase de tipo apatítico: hidroxiapatita estequiométrica, hidroxiapatita deficiente en calcio o hidroxiapatita carbonatada, de baja cristalinidad similar a la hidroxiapatita biológica, y que puede incorporar distintos iones en función de la composición de los reactivos y del medio. Sin embargo existen también, formulaciones que dan como producto de la reacción fosfato dicálcico dihidratado o brushita. El primero en describir este tipo de cementos fue Lemaitre en 1987 ^[15] que se obtuvo un CFC de brushita mezclando monofosfato cálcico con β -TCP. Por tanto, dependiendo del resultante de la reacción química, existen dos grandes familias de cementos de fosfato cálcico: cementos de hidroxiapatita (HAP) y cementos

Introducción

de dihidrato de fosfato dicálcico o brushita (DCPD). La mayor parte de los estudios han desarrollado cementos de hidroxiapatita, debido a sus buenas propiedades mecánicas, que está presente en el hueso y porque fragua a un pH neutro. Además, la hidroxiapatita que se forma durante el fraguado es más parecida a la apatita biológica que la hidroxiapatita cerámica. Sin embargo, los cementos de brushita han comenzado a despertar interés debido a su capacidad de ser reabsorbidos por el organismo de manera mucho más rápida que la HA. La reabsorción de la HA es debida principalmente a la acción celular y está limitada a la superficie del material, ya que las células no pueden penetrar la estructura microporosa del cemento y este se mantiene estable en el organismo durante periodos superiores a los 12 meses. Por el contrario, los cementos de brushita son más solubles y reabsorbibles que los de HA a un pH fisiológico de 7,4. El uso de cementos de brushita estaría dirigido a situaciones en la que es necesaria regeneración ósea, ya que la velocidad de reabsorción *in vivo* del biomaterial debe ser similar a la neoformación del hueso (20 $\mu\text{m}/\text{día}$); mientras que los de HA se utilizarían cuando la reabsorción del material fuera innecesaria ^[111, 112, 113].

Los cementos de brushita se preparan mediante una reacción ácido-base que ocurre entre el fosfato tricálcico-beta y protones donados por un fosfato cálcico ácido como el fosfato monocálcico dihidrógeno, o simplemente aportados mediante una solución ácida. El tiempo de fraguado de estos cementos es muy rápido lo que hace complicado en ocasiones su uso clínico, además la brushita puede llegar a reabsorberse a una velocidad ligeramente superior a la de formación del hueso, lo que puede aportar un gran interés en los procesos de regeneración ósea ^[114, 115]. En el hueso, la brushita es una de las primeras fases de fosfato cálcico que se forma en el comienzo de la nucleación y crecimiento de los cristales de HAP, siendo un mineral importante en el crecimiento de la HA *in vivo* ^[116].

Los cementos de brushita pueden mejorar sus propiedades incorporando en su composición sustancias que prolonguen el tiempo de fraguado, mejoren sus propiedades mecánicas, optimicen su manejo clínico o estimulen la regeneración ósea. Con el fin de perfeccionar estos sustitutos óseos, se estudia la incorporación de determinados iones que puedan aportar cambios beneficiosos en alguna de sus propiedades.

Tabla 4: Algunas formulaciones de cementos de fosfato cálcico ^[13].

Componentes	Producto final
Fosfato de calcio amorfo (ACP) Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	HA
Fosfato tricálcico α (α -TCP) Carbonato cálcico Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	HA carbonatada
Fosfato tetracálcico (TetCP) Fosfato dicálcico (DCP)	HA
Fosfato tricálcico α (α -TCP) Fosfato tetracálcico (TetCP) Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	HA
Fosfato tricálcico α (α -TCP) Fosfato dicálcico (DCP) Carbonato cálcico Hidroxiapatita precipitada	HA carbonatada
Fosfato tricálcico α (α -TCP) Fosfato tetracálcico (TetCP) Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	HA
Fosfato tricálcico β (β -TCP) Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	Fosfato dicálcico dihidratado (brushita)

3.2.2.1 CEMENTOS DE FOSFATO CÁLCICO SUSTITUIDOS CON SILICIO

En el presente estudio, trataremos de introducir iones de silicio (SiO_4^{4-}) en los cementos de fosfato cálcico, y valorar la importancia que esto tiene tanto para sus propiedades químico-físicas como en los procesos metabólicos, asociados con el desarrollo de hueso y los tejidos conjuntivos.

Introducción

El silicio (Si) tiene propiedades biocompatibles y biodegradables, lo que en principio le hace un buen candidato para materiales que tengan aplicaciones médicas. Es el segundo elemento en orden de abundancia en la corteza terrestre (27,7% en peso) sólo precedido por el oxígeno (47%) y seguido del aluminio (8,2%). A pesar de su gran abundancia, el papel biológico de estos tres elementos es muy diferente. Mientras que el oxígeno es un componente mayoritario de todos los seres vivos, el silicio solo se encuentra a nivel de trazas en la mayor parte de los organismos y aunque se considera un elemento esencial, su función biológica es solo indirecta.

Algunas de sus propiedades son:

- Biocompatibilidad: es un material relativamente bioinerte cuando se enlaza a tejidos vivos. Se ha utilizado en la fabricación de implantes.
- Biodegradabilidad: el silicio nanoestructurado se degrada sin aparente toxicidad *in vivo*. Se ha utilizado en la fabricación de materiales implantables.
- Estabilidad cristalina: estructuras térmicas y mecánicamente resistentes.
- Micromecanizabilidad: aplicable en microsensores y microactuadores.
- Pureza: el silicio para aplicaciones electrónicas tiene una pureza del 99,9%.
- Luminiscencia: partículas fluorescentes visibles mediante nanoestructurador.
- Absorción de luz: para fotodiodos para espectro visible o infrarrojo cercano.
- Semiconductividad: microelectrónica y medición precisa de tiempos basada en osciladores.

La asequibilidad es muy limitada ya que se encuentra casi exclusivamente en forma de sílice, silicatos y aluminio-silicatos, todos ellos compuestos insolubles en agua. Para que un elemento pueda ser absorbido por un ser vivo debe formar alguna especie química soluble en agua a pH neutro. En el caso del silicio, la única forma ligeramente soluble en agua en estas condiciones es el ácido silícico $\text{Si}(\text{OH})_4$, que puede encontrarse a pH 7 en una concentración máxima de 2 mM. En estas condiciones, el ácido silícico existe como una especie monómera y eléctricamente neutra. A mayor concentración, se producen reacciones de condensación y polimerización a través de la formación de enlaces Si-O-Si, precipitando en último término dióxido de silicio hidratado y amorfo. Las aguas naturales, en equilibrio con SiO_2 y los diversos silicatos minerales contienen, por lo tanto, ácido silícico aunque generalmente a muy bajas concentraciones debido a la presencia de diversos iones metálicos, como el Ca^{2+} , que

Introducción

disminuye la solubilidad del ácido silícico en agua. El agua intersticial de los suelos puede tener hasta 1 mM en Si(OH)_4 , mientras que el agua de los ríos como mucho 150 μmoles por litro (10ppm) y el agua del mar tan solo 0,03-2 ppm. Las diatomeas, microorganismos unicelulares de vida acuática, tienen la capacidad de absorber y concentrar el ácido silícico presente en el agua en forma de $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ con el que constituyen un exoesqueleto protector. Cuando el organismo muere la materia orgánica se descompone quedando tan solo el exoesqueleto silíceo, la acumulación de estos restos a lo largo del tiempo geológico ha originado a la tierra de diatomeas, esencialmente, sílice biomédica. El crecimiento de las plantas exige la absorción de grandes cantidades de agua, aproximadamente, 600 litros por kg de peso. El agua saturada de ácido silícico se absorbe a través de las raíces y se evapora en las partes aéreas, el dióxido de silicio se acumula en su interior formando pequeños gránulos llamados fitolitos, abundantes en hierbas y cereales. Los animales ingieren silicio a través del agua de los alimentos. Esta ingesta es especialmente importante en los animales herbívoros. Los seres humanos ingerimos unos 30 mg al día, procedentes en su mayor parte del consumo de cereales (60%) y del agua y otras bebidas (20%) ^[117].

La esencialidad del silicio (Si) para la vida animal fue establecida en los años 70. Los resultados demostraron que una deficiencia en silicio produce retraso en el crecimiento, defecto del desarrollo de huesos y formación defectuosa del tejido conectivo ^[7, 118, 119]. El Si ha mostrado su eficacia también como suplemento dietético, al aumentar la densidad mineral ósea ^[120], estimular la síntesis del cartílago ^[121], inhibir el proceso fisiológico de reabsorción ósea ^[122] y su importancia para la salud vascular ^[123]. Lo encontramos en cantidades traza en la apatita ósea, demostrándose que el contenido en Si, es mayor durante los procesos iniciales de mineralización, descendiendo en los estados más avanzados, al incrementarse el porcentaje Ca/P para la formación de HA ^[18, 19]. En 1970 Carlisle sugirió que el silicio podría ser afín, a la inicialización de la mineralización de los tejidos preóseos ^[7, 18, 119, 124]. Desde entonces, el efecto positivo del Si sobre el metabolismo del hueso, ha despertado el interés por incorporar al ion, dentro de distintos materiales de regeneración ósea ^[20, 21, 23, 24, 25].

Introducción

Muchos materiales con contenido en silicio como las cerámicas (Bioglass, Sintered hidroxiapatite y glass-ceramic A-W), se adhieren espontáneamente al hueso vivo. Estos materiales llamados bioactivos, son usados clínicamente y comercializados como sustitutos óseos en intervenciones quirúrgicas ^[125]. Los iones de sílice aumentan la bioactividad de la HA pura, enfatizando las potenciales aplicaciones biomédicas de estas cerámicas ^[126]. Existen estudios *in vitro* que han manifestado que el Si acuoso, podría mejorar la proliferación y diferenciación osteoblástica, así como la síntesis de colágeno ^[20]. Ya que cuando los niveles del ion permanecían por debajo de los 30 ppm estimulaban el desarrollo de los osteoclastos, mientras que niveles superiores inhibían su desarrollo ^[127]. Otros estudios han obtenido mejores resultados, en cuanto a la fluidez y la inyectabilidad, al utilizar sales de sílice en los cementos de fosfato cálcico ^[128].

Al estudiar la estructura de la HA y α -TCP sustituida por silicio (Si-HA y Si- α -TCP), se concluyó que el modelo más sencillo para explicar la incorporación del ión a los fosfatos cálcicos, es la sustitución de los grupos PO_4^{3-} por los de SiO_4^{4-} . Esta sustitución genera un déficit de carga eléctrica, por lo que son necesarios mecanismos de compensación para recuperar la neutralidad y evitar un coste energético grande. Por ello, considerando las vacantes de grupos OH^- y de O^{2-} , como mecanismos de compensación, se propusieron las siguientes fórmulas químicas para Si-HA $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Si}_x(\text{SiO}_4)_x\text{OH}_{1-x}]$ y el Si- α -TCP $[\text{Ca}_3(\text{P}_{1-x}\text{Si}_x\text{O}_{4-x/2})_2]$ ^[20, 21, 24].

Además, las cerámicas de fosfato cálcico sustituidas por silicio han demostrado un buen comportamiento biológico respecto a las que no estaban sustituidas ^[20, 23, 24]. Estos resultados se atribuyen a varios factores que actuarían sinérgicamente. Por un lado, la sustitución iónica por silicio facilita la precipitación de HA biológica ^[129, 130, 131], que favorece la adsorción de proteínas, la adhesión y proliferación de los osteoblastos. Y por otro lado, el ion de silicio liberado en la matriz extracelular o presente en la superficie del implante, podría poseer un efecto directo en los osteoblastos, osteoclastos y la síntesis del colágeno ^[127, 132, 133, 134, 135, 136].

La implantación *in vivo* de biomateriales sustituidos con Si se ha realizado en diferentes estudios, como el de Patel et al. ^[25] que aumentaron el crecimiento óseo un 14,5% más en la Si-HA, frente a la HA no sustituida. También se observó la formación de fibrillas de colágeno, en la superficie de Si-HA, a las de 6 semanas de su

Introducción

implantación, a diferencia de la HA no sustituida que se formaban a las 12 semanas. Hing et al. ^[21] utilizaron una estructura de HA porosa, con un contenido de silicio del 0.8% (peso/peso), mejorando sus resultados en términos de aposición ósea, crecimiento y adaptación del remodelado óseo. Mientras que Camiré et al. ^[22], experimentaron un efecto positivo sobre la actividad osteoclástica, osteoblástica y la integración de hueso, al incorporar 1% Si- α -TCP en HA deficiente en calcio. También se ha estudiado la degradabilidad de estos materiales, quedando tan solo del 10 al 20% del material incorporado, después de 1 año de su implantación, y su completa reabsorción y reemplazo por nuevo tejido óseo, después de 2 años ^[137]. Sin embargo, no existe una evidencia científica, que demuestre que la reabsorción *in vivo* mejora con el Si-HA ^[138]. Esto hace más atractiva la investigación de la sustitución iónica por silicio en otros fosfatos cálcicos, más reabsorbibles, ya que la completa transducción a hueso maduro, evitaría las complicaciones que pudieran surgir de las bajas propiedades mecánicas de los fosfatos cálcicos.

No existe ningún estudio sobre la sustitución iónica de silicio, para mejorar el funcionamiento biológico de los cementos osteotransductivos de brushita. Recientemente, Alkhraisat et al. ^[4] mostraron que la modificación de cementos de brushita con gel de sílice, mejora su cohesión, acelera su reacción de fraguado y aumenta la presencia de β -TCP en la matriz del cemento. La modificación del sistema de cementos de β -TCP/fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) con silicato tricálcico (Ca_3SiO_5), produjo además un cambio drástico en el producto de fraguado, mientras los cementos no modificados fraguan en brushita, los cementos modificados con Si fraguan en HA ^[139]. Lo que explicaría la presencia de una mayor cantidad de injerto residual, 8 semanas después de su implantación *in vivo*.

Por tanto, los cementos de fosfato cálcico sustituidos con sílice, pueden representar una buena alternativa como sustitutos óseos, tratando de mejorar la interacción entre el injerto y el tejido, así como la degradación del material implantado, favoreciendo la osteotransducción ^[18, 19].

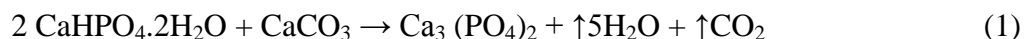
VI.- MATERIAL Y MÉTODO

1. SÍNTESIS DEL MATERIAL

El cemento de fosfato cálcico (CFC) consta de 2 fases, que al mezclarlas fraguan a temperatura ambiente:

- La fase sólida: formada por 2 gramos de fosfato tricálcico- β (β -TCP), mezclados con 1,5 gramos de fosfato monocálcico monohidratado (MCPM).
- La fase líquida: compuesta por ácido cítrico al 1M.

La cerámica de fosfato tricálcico- β (β -TCP), se obtuvo por sinterizado de una mezcla estequiométrica de fosfato dicálcico dihidratado o brushita (DCPD: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) y carbonato cálcico (CC: CaCO_3), a 1100°C durante 14 horas. Produciéndose la siguiente reacción:



La fuente de iones de silicio en el sistema del cemento fue una cerámica de β -TCP modificada con iones de silicio. Para ello, se reemplazó el DCPD (fosfato dicálcico dihidratado o brushita) con dióxido de silicio (SiO_2 ; Silica fumed Sigma®) a distintas relaciones molares, y se incrementó la cantidad del CC, para mantener la relación molar $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$ constante e igual al valor 1,5 (Tabla 5), dado que esta relación molar es igual a la del β -TCP. A partir de ahora utilizaremos las iniciales Si-TCP para referirnos a las cerámicas dopadas con silicio y Si-CFC para los cementos de fosfato cálcico obtenidos con dichas cerámicas.

Una vez obtenida la cerámica, esta se trituro y tamizó, para obtener un polvo con un tamaño de partícula ≤ 200 micras. Para formar la fase sólida del cemento se mezcló ese polvo con fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) en una relación equimolar. La fase líquida estaba constituida por una solución de ácido cítrico 1 M. El cemento se obtuvo mezclando la fase sólida con la fase líquida en una relación polvo/líquido (p/l) que oscilaba de 1,5 a $3 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Con dicha mezcla se fabricaron cilindros de cemento de 10 mm de diámetro y 5 mm de grosor, utilizando moldes de silicona (Figura 7).

Material y método

Tabla 5. La cantidad molar de reactivos se calculó en el supuesto de que el silicio pudiera sustituir al fósforo.

Material	CaCO ₃ (mol)	DCPD (mol)	SiO ₂ (mol)	[Si/(Si+P)] (%)
β-TCP	1	2	0	0
10%-Si-β-TCP	1.2	1.8	0.2	10
20%-Si- β-TCP	1.4	1.6	0.4	20
40%-Si- β-TCP	1.8	1.2	0.8	40
60%-Si- β-TCP	2.2	0.8	1.2	60
80%-Si- β-TCP	2.6	0.4	1.6	80



Figura 7. Se muestran los materiales para preparar el cemento de fosfato cálcico y realizar las pastillas cilíndricas de cemento.

La síntesis y caracterización de los materiales preparados en esta tesis se llevaron a cabo en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

2.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X Y ANÁLISIS DE RIETVELD

En la caracterización estructural de materiales cristalinos se emplea la difracción de rayos X, ya que con esta técnica se determina la estructura cristalina del material así como el análisis cualitativo y cuantitativo de fases e imperfecciones en la estructura.

Se utilizó la técnica de rayos X para identificar las estructuras cristalinas presentes en las cerámicas con distintos grados de iones de silicio y en sus respectivos cementos cálcicos. Este método se basa en el modelo de Bragg ^[140], que describe la estructura cristalina como un conjunto de planos que reflejan los rayos X. La longitud de onda de los rayos X, es del mismo orden de magnitud que la distancia entre planos en el cristal y así, produce un patrón único por las interferencias de los rayos reflejados por los distintos planos, separados por una distancia d que viene dada por la expresión ^[141]:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2)$$

Dónde:

d : la distancia entre planos del cristal.

θ : el ángulo de la radiación incidente.

n : el orden de la reflexión.

λ : la longitud de onda de los rayos X.

Uno de los problemas que se han detectado al aplicar esta técnica, es la identificación de las fases existentes en muestras policristalinas, que presentan picos de difracción que se superponen, ya que tienen la misma distancia interplanar, y por consiguiente dificultan la determinación de la estructura cristalina de cada una de ellas, debido al fuerte solapamiento entre las reflexiones de Bragg. En las películas policristalinas además de presentarse el problema anterior, en ocasiones el material que se deposita cristaliza con cierta dirección preferencial ^[142]. Por ello la difracción de rayos X se complementa con el método de Rietveld, es una técnica de refinamiento que tiene la capacidad de determinar con mayor precisión parámetros estructurales de la muestra, a partir de la construcción de un modelo teórico que se ajusta al patrón de difracción experimental, mediante el método de mínimos cuadrados. En el modelo teórico se incluyen aspectos estructurales tales como: estructura cristalina, grupo

Material y método

espacial, posición de los átomos en la celda unitaria, etc. Así mismo, en el modelo teórico se incluyen factores microestructurales que contemplan la concentración de las fases presentes, tamaño de cristal y microdeformaciones ^[143].

Para este estudio se realizaron muestras al 10, 20, 40, 60 y 80% de la cerámica Si-TCP, estableciéndose como grupo control la cerámica de β -TCP sin sustituir. También se realizó con los cementos sustituidos con silicio (Si-CPC) al 10, 20, 40, 60 y 80% de silicio comparándolos con el cemento sin sustituir, cada cemento se preparó con la relación polvo/líquido (p/l) más adecuada para cada material oscilando de 1,5 a 3 g.ml⁻¹. Las muestras se secaron a 37° C en la estufa durante 24 h, y después se trituraron en un mortero para analizarse en forma de polvo.

Para realizar la difracción de rayos X se utilizó el difractómetro Philips X`pert (Cu-Ka radiation, 45 KV, 40 mA), los datos se obtuvieron en el intervalo $2\theta=3-60^\circ$, con un tamaño de paso de 0.02° , y una velocidad de barrido angular de 1 segundo/paso. Para el análisis estructural de las cerámicas, utilizamos los el registro de patrones de difracción de rayos X del modelo estructural del fosfato tricálcico- β (β -TCP) (pdf-ref 70-2065) y silicato de fosfato cálcico $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2 \text{SiO}_4$ (pdf-ref 04-393). La composición del cemento se estudió utilizando los archivos anteriores y además los archivos de brushita (pdf-ref 72-713), monetita (pdf-ref 71-1760) e hidroxiapatita (pdf-ref 55-592). Se realizó el análisis de Rietveld para refinar los parámetros de celdilla del β -TCP y de la brushita, con objeto de estudiar la influencia del silicio en sus estructuras.

La difracción de rayos X se realizó en el Servicio del CAI de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS

La espectroscopia de infrarrojos sirve para estudiar las vibraciones de los átomos de una molécula. Al irradiar la molécula con infrarrojos absorbe una parte de la radiación en unas longitudes de onda específicas, lo que provoca vibraciones por excitación en la misma. Cada molécula absorbe a distintas longitudes de onda la radiación, siendo su espectro de absorción característico y específico para cada una.

Material y método

Para realizar la espectroscopia de infrarrojos se pulverizaron a mano las muestras de Si-CPC a 20, 40 y 80% de silicio, en un mortero de ágata y se mezclaron con bromuro potásico (KBr), en relación de 250 mg bromuro potásico por cada 5 mg de muestra. Se prepararon con las distintas muestras discos translucidos, utilizando una presión hidráulica y un troquel cilíndrico de 13 mm de diámetro. La transmisión de los espectros infrarrojos se registró mediante un espectrofotómetro de infrarrojos (Perkin-Elmer 1720) utilizando la transformada de Fourier con un rango de 4000-400 cm^{-1} y una resolución espectral de 2 cm^{-1} . Se empleó como fondo la señal de un disco translucido de KBr.

La determinación de la Espectroscopia de Infrarrojos se realizó en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos con alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$). Básicamente en el SEM, un haz de electrones primarios incide sobre la superficie de una muestra, produciéndose la emisión de electrones secundarios por la dispersión inelástica entre el haz de electrones incidentes y los electrones de los átomos de la superficie de la muestra. Estas emisiones serán captadas por detectores sensibles a los electrones que lo convierten en imagen. Al mover el haz de electrones primarios sobre la superficie de la muestra obtendremos un mapeo o barrido de esta.

Se utilizó el microscopio electrónico de barrido SEM JSM6400 para analizar la morfología de la superficie del cemento, después del test de la fuerza de tensión diametral (FTD). Para ello, se fijaron las muestras de Si-CFC sustituidas al 20, 60 y 80% de silicio con una relación p/l de 1,5 a 3 g.ml⁻¹, en un porta-muestras de cobre, utilizando una cinta de grafito y recubriéndose posteriormente con oro mediante deposición de vapor utilizando una metalizadora (Emitech modelo K550X). También, se analizó el contenido del calcio, fósforo y silicio de cristales individuales, utilizando la técnica de espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) acoplada al SEM.

Material y método

La microscopía electrónica de barrido se realizó en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

2.4 DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE FRAGUADO

El tiempo de fraguado final de los cementos (N=5; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) se midió bajo las condiciones atmosféricas normales del laboratorio (20-23° C y 50-60% humedad). El tiempo de fraguado se determinó mediante la prueba de la aguja de Vicat, de 1mm de diámetro cargada con un peso de 400g (Figura 8), de acuerdo con el estándar internacional ISO1566 para los cementos dentales de fosfato de zinc. El tiempo inicial de fraguado se consideraba nada más mezclar la fase sólida con la líquida, que después se introducían en los moldes de silicona. Cada 30 segundos se medía el grado de fraguado mediante la aguja de Vicat, hasta que el peso de la aguja no dejaba ningún tipo de huella visible sobre el cemento, lo que se consideraba el tiempo final del fraguado ^[144, 145]. Para ello realizamos muestras del Si-CFC sustituido al 10, 20, 40, 60 y 80% de silicio, estableciéndose como grupo control el cemento sin sustituir con silicio, cada cemento se preparó con la relación p/l más adecuada para cada material, oscilando de 1,5 a 3 g.ml⁻¹.

Se calculó la media \pm DE (desviación estándar) con el programa OriginPro 8®, para los valores del tiempo de fraguado obtenidos con los cementos a distintas concentraciones de silicio.

La determinación del tiempo de fraguado se realizó en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

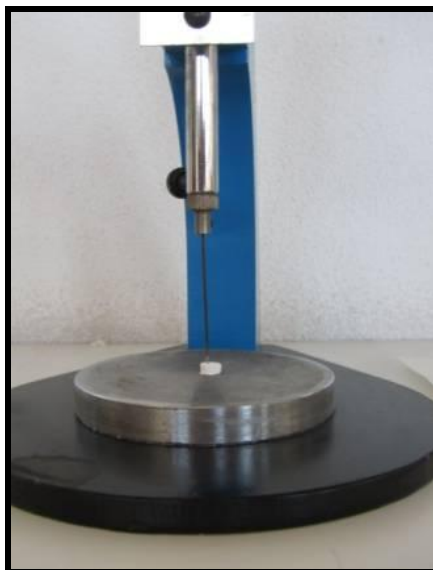


Figura 8. Aguja de Vicat de 1mm de diámetro cargada con un peso de 400g sobre una pastilla de CFC ya fraguada.

2.5 DETERMINACIÓN DE LA FUERZA DE TENSIÓN DIAMETRAL (FTD)

Las propiedades mecánicas de los Si-CFC se determinaron en muestras cilíndricas (N=5; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) al 10, 20, 40, 60 y 80% de silicio frente al grupo control de CFC sin silicio, con una relación p/l de 1,5 a 3 g.ml⁻¹. Las muestras se incubaron en agua bidestilada, a 37° C durante 24 horas. Después, se procedió a medir la fuerza necesaria para romper el cilindro de cemento cálcico utilizando un durómetro (Pharma Test PTB 311) a una velocidad de aplicación de carga 1 mm/min. La fuerza de tensión diametral (FTD) se calculó (Ec. (3)), a partir de la fuerza de carga aplicada a lo largo del plano diametral de la muestra necesaria para romperla.

$$FTD (MPa) = (2 * Dureza (N)) / (\pi * Espesor (mm) * Diámetro (mm)) \quad (3)$$

Se calculó la media \pm DE para los valores de FTD, obtenidos para los cementos con las distintas concentraciones de silicio, mediante el programa OriginPro 8®.

La fuerza de tensión diametral se realizó en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

2.6 DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD

Para el análisis de la estructura de los cementos porosos se utilizó un porosímetro de mercurio. Esta técnica determina el volumen de mercurio forzado a entrar en los poros en función de la presión, la cual está relacionada con el tamaño de poro. Se aplica presión al mercurio de forma progresiva, produciéndose una intrusión gradual del mercurio en el medio poroso evacuado, seguida por la extrusión (es decir la expulsión del mercurio desde la estructura porosa) a medida que la presión va disminuyendo. A baja presión, el mercurio solo está forzado a penetrar en canales porosos de gran diámetro de la muestra, por tanto el cambio de volumen de mercurio es pequeño. Cuando se aumenta la presión, el mercurio penetra en los poros más pequeños y se produce una gran reducción del volumen de mercurio ^[146, 147].

Realizamos muestras cilíndricas de Si-CFC al 20, 40, 60 y 80% de silicio (N=5; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) cada cemento se preparó con una relación p/l a 1,5 g.ml⁻¹. Después de fraguar las muestras, se secaron a 37° C en la estufa durante 24 h. La porosidad y la distribución de los poros en el cemento, se determinaron utilizando un porosímetro de alta presión de mercurio (Micrometrics 9420, UK).

La determinación de la porosidad se realizó en el Servicio SEGAI de la Universidad de La Laguna de Tenerife.

2.7 ANÁLISIS BET DEL ÁREA DE SUPERFICIE ESPECÍFICA

El área de superficie específica del cemento (SSA) se midió utilizando el método Brunauer-Emmett-Teller (BET; GEMINI, Micrometrics, USA). La técnica se basa en la adsorción de un gas inerte, como el nitrógeno, a baja temperatura sobre una superficie sólida y limpia, hasta que la llena en su totalidad formando múltiples capas. Lo que permite evaluar la superficie total de la muestra. El cálculo se realizó mediante la ecuación de BET (Ec. (4)), que permite el cálculo de la monocapa sobre la superficie ^[148, 149].

$$\frac{P}{V_a (P_o - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \frac{P}{P_o} \quad (4)$$

Material y método

Donde:

V_a : la cantidad de gas adsorbido a la presión P .

V_m : la cantidad de gas adsorbido cuando toda la superficie está cubierta por una capa monomolecular del gas.

C : una constante.

P_o : la presión de saturación del gas.

Realizamos muestras cilíndricas de Si-CFC sustituido con silicio al 20, 40, 60 y 80% de silicio ($N=5$; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) cada cemento se preparó con una relación p/l de $1,5 \text{ g.ml}^{-1}$. Después de fraguar las muestras, se secaron a 37°C en la estufa durante 24 h.

La determinación del análisis de la superficie específica se realizó en el Servicio SEGAI de la Universidad de La Laguna de Tenerife.

2.8 LIBERACIÓN DE IONES

Mediante la espectroscopia de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles de traza y ultratrazas, partiendo de muestras en disolución acuosa. La muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador, donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización, que consiste en un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante, inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. En estas condiciones los átomos presentes en la muestra son ionizados/excitados. Al volver a su estado fundamental, estos iones o átomos excitados emiten radiaciones de una longitud de onda que es característica de cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud onda. A continuación un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra.

Material y método

Se investigó la liberación de iones de Ca^{2+} , SiO_4^{4-} y PO_4^{3-} en los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP, cada cemento se preparó con una relación p/l de $1,5 \text{ g.ml}^{-1}$. Se incubaron muestras cilíndricas ($N=5$; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) de dichos cementos en agua bidestilada a 37°C , durante 7 días. El medio se renovó cada 24 horas, midiéndose la concentración de iones liberados en dicho medio mediante espectrometría de emisión óptica de plasma inductivo. Estas medidas se contrastaron con soluciones estándar de iones de Ca^{2+} , SiO_4^{4-} y PO_4^{3-} obtenidos de Merck. También se midió el pH del agua bidestilada que había contenido cada muestra utilizando pH-metro (Mettler-Toledo, Barcelona, Spain).

La liberación de iones se realizó en el ICP-PES de la Universidad Complutense de Madrid.

3. ESTUDIO IN VITRO DE CITOCOMPATIBILIDAD

3.1 PROLIERACIÓN Y ACTIVIDAD CELULAR

Para la prueba de citocompatibilidad, se cultivaron las células de la línea celular humana tipo osteoblastos MG-63 (ATCC no. CRL-1427, Rockville, MD, USA) ^[150] en el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina y 1% estreptomycin (Invitrogen Life Technologies), en una incubadora a 5% CO_2 , y 37°C .

Para estudiar la influencia del silicio, se prepararon cilindros ($N=8$; 8 mm de diámetro y 3 mm de espesor) de CFC y Si-CFC al 20, 40 y 80% de silicio, cada cemento se preparó con la relación p/l más adecuada para cada material, oscilando de $1,5$ a 3 g.ml^{-1} , como control se empleo el agar directamente en la placa. Los cilindros se lavaron en agua bidestilada, este proceso se repitió hasta conseguir un pH estable del agua. Después se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizó la desinfección de las muestras, en 70% etanol, durante 60 minutos.

Las muestras se colocaron por triplicado, en una placa de 24 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) (Figura 9) y se sembraron las células con una densidad inicial de

Material y método

50.000 células por pocillo. La proliferación y la viabilidad celular, se evaluó después de 3, 5, 7 y 10 días de cultivo.

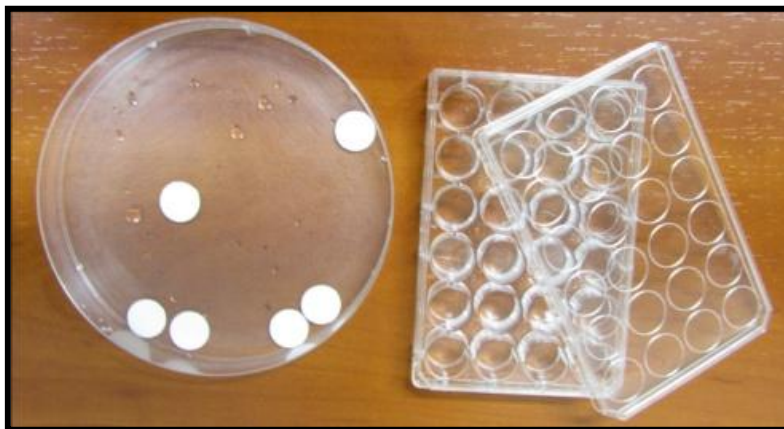


Figura 9. Las muestras de CPC se colocaron en pocillos.

La proliferación celular se midió vía recuento celular electrónico, utilizando el analizador celular CASY 1 TTC (Schärfe System, Reutlingen, Alemania). Para ello se lavaron las células dos veces en PBS y se despegaron de la superficie de la muestra, mediante la incubación con 1 ml de acutasa (PAA, Cölbe, Alemania) a 37° C durante 7 minutos. La reacción enzimática se neutralizó añadiendo igual cantidad de DMEM. Después de mezclar bien la suspensión celular, se diluyó (1:100) en 10 ml Isoton III (Beckmann Coulter, Krefeld) y se recontaron las células. El número de las células se determinó automáticamente con Casy-State software (Schärfe System, Reutlingen, Alemania).

También se evaluó la viabilidad celular utilizando el reactivo de proliferación celular WST 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las células se incubaron con el reactivo WST, en relación 1:100 durante 30 minutos en la incubadora a 37° C. A continuación, se midió la adsorción del sobrenadante, utilizando el lector de placas “Tecan Spectra Fluor Plus” (Tecan, Crailsheim, Alemania).

Se calculó la media y la desviación estándar de las medidas. El significado estadístico de las diferencias se analizó aplicando el análisis de variancia ANOVA de dos factores utilizando el programa OriginPro 8®. Previamente se comprobó la

Material y método

normalidad mediante el test Shapiro-Wilk. A posteriori, se realizó el test post hoc de Tukey ($P < 0.05$).

El estudio de citocompatibilidad de los cementos sustituido con silicio fue realizado en Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry, de la Facultad de Odontología, de la Universidad de Würzburg de Alemania.

3.2.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM; JSM6400) se analizó la morfología micro-estructural de este material como soporte para cultivos celulares. Realizamos otro cultivo bajo las mismas condiciones con las que se realizó la prueba de citocompatibilidad utilizando la misma línea celular humana tipo osteoblastos MG-63 (ATCC no. CRL-1427, Rockville, MD, USA) y con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina y 1% estreptomicina (Invitrogen Life Technologies), en una incubadora a 5% CO_2 , y 37° C. Las muestras eran cilindros ($N=3$; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) de CFC y Si-CFC al 20, 40 y 80 % de silicio, cada cemento se preparó con la relación polvo/liquido más adecuada, oscilando de 1,5 a 3 g.ml^{-1} . Antes de sembrar los cilindros se lavaron en agua bidestilada. Este proceso se repitió, hasta conseguir un pH estable del agua. Después se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizó la desinfección de las muestras en 70% etanol, durante 60 minutos.

Las muestras se colocaron por duplicado en placas de 24 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) y se sembraron con una densidad inicial de 50.000 células por pocillo (Figura 10). El medio de cultivo se cambió cada 2 días para asegurarnos de la viabilidad celular. Las muestras se sacaron del medio de cultivo en función del día que deseábamos estudiar, en nuestro caso los días 3, 5, 7 y 10, se lavaban 2 veces con PBS (pH 7.4 y 0.1 molaridad) y se fijaban las células a la muestra con una mezcla compuesta por glutaraldehído al 2.5% y formaldehído al 4%, dejándolo actuar una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retiraba dicha mezcla y se lavaba 2 veces con PBS. A continuación se deshidrataban las muestras en una serie de concentraciones de alcohol al 30, 50, 70, 80, 90, 95 y 100%, actuando de 10 a 15 minutos en cada paso,

Material y método

inmediatamente se secaban en el punto crítico. Después las muestras se fijaban en un porta-muestras de cobre, utilizando una cinta de grafito, se les recubría con grafito por medio de un evaporador de metales y posteriormente con oro mediante deposición de vapor. Una vez realizada dichas operaciones se estudiaron en el microscopio electrónico de barrido SEM, en las que se valoraron la superficie de las muestras y la interacción de los osteoblastos con el material en función del día de cultivo.

Este estudio se realizó en el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. El análisis de microscopía electrónica de barrido se realizó en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

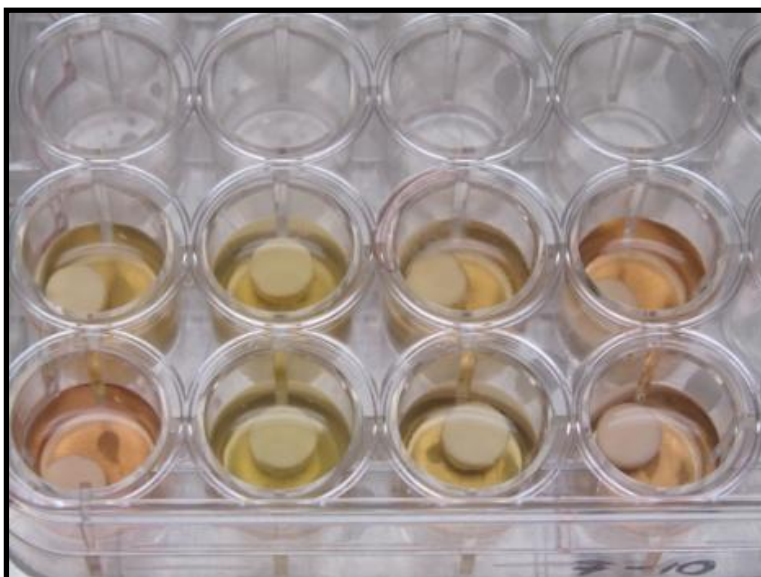


Figura 10: Cultivo de las muestras de CPC con distintas concentraciones de silicio

4. EFICACIA DEL CEMENTO COMO MATRIZ PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

4.1 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Los CPC también pueden actuar como vehículo de medicamentos, ya que proporciona altas concentraciones del medicamento localmente y niveles sistémicos bajos, de este modo reduce los efectos secundarios asociados. En las cerámicas de fosfatos cálcicos la droga es absorbida por la superficie, mientras que en los cementos

Material y método

de fosfato cálcico la droga puede incorporarse también en el interior del material añadida tanto a su fase líquida como a su fase sólida ^[151].

La eficacia de los cementos de fosfato cálcico dopados con silicio, para la liberación controlada de medicamentos se realizó utilizando como fármaco modelo la vancomicina. Se eligió este antibiótico por estar implicado en la profilaxis de infecciones nosocomiales de hueso por *Staphylococcus Aureus* y por no mostrar interacción con la matriz de fosfato cálcico ^[152].

Adsorción - desorción del antibiótico:

Hemos estudiando tanto la adsorción del antibiótico en la superficie de los cementos como la liberación del antibiótico, utilizando un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV-Vis; Varian Cary 300 Bio spectrophotometer). Antes de realizar las mediciones establecimos la curva de calibración, entre la concentración del antibiótico y la absorbancia UV a una longitud de onda de 237 nm utilizando soluciones estándar de vancomicina y una cubeta de cristal de 1 cm de longitud.

Adsorción:

La adsorción del antibiótico se estudió mediante la incubación de cilindros (N=3; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) de CPC y Si-CFC al 20, 40 y 80% de silicio, con una relación p/l de 1,5 g.ml⁻¹. Dichos cilindros se incubaron durante 24 h en tres soluciones con una concentración de vancomicina de 5, 10 y 20 mg/ml, a 37° C y agitación de 90 rpm. Tras 24 h de incubación, se retiraron las muestras del medio de incubación y se disgregaron los cilindros de cemento en 10 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 2.5 M para determinar la cantidad adsorbida del antibiótico. La concentración de antibiótico adsorbido se determinó mediante el espectrofotómetro UV-VIS y la curva de calibración.

Desorción:

También se realizó un seguimiento durante 7 días para valorar la cinética de desorción del antibiótico de los cementos. Las muestras se incubaron primero en el antibiótico a 5, 10 y 20 mg/ml durante 24 h y luego se mantuvieron en 10 ml de tampón fosfato (pH de 7.4), a 37° C con una agitación de 90 rpm. Este medio tampón se cambiaba a los 30 min, 1 h, 3 h, 5 h y 7 h durante el primer día y cada 24 h los días

Material y método

consecutivos. La concentración del antibiótico liberado en el medio se medía utilizando el espectrofotómetro UV-VIS. Tras terminar el estudio se descompusieron las muestras en 10 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 2.5 M para medir la cantidad de antibiótico remanente.

Liberación del antibiótico:

Otra forma de introducir el antibiótico en el cemento es mediante la incorporación del antibiótico en su fase sólida antes de realizar la mezcla con su fase líquida para formar el cemento.

Para ello se incorporaron 100 mg, como dosis alta, y 8,4 mg, como dosis baja, de vancomicina por cada 2g de fase sólida del cemento (1.14 g de β -TCP y 0.86 MPCM) y se mezcló en un mortero de vidrio durante 15 minutos. Una vez obtenida la mezcla se incorporaba la fase líquida de ácido cítrico al 1M en una relación p/l de 1,5 g.ml⁻¹. Después, se incubaron los cilindros de cada cemento (N=3; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) de CFC y Si-CFC al 20, 40 y 80% de silicio.

Estudiamos la liberación del antibiótico de los cementos durante 7 días mediante el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible a una longitud de onda de 237 nm. Las muestras se incubaban en 5,12 ml de solución tampón fosfato (pH de 7.4), a 37° C, con agitación a 90 rpm. El medio de incubación se cambiaba cada 30 min, 1 h, 3 h, 5 h y 7 h durante el primer día y después cada 24 h los días consecutivos, y se medía la cantidad de antibiótico. Tras terminar el estudio se descompusieron las muestras en 10 ml de ácido clorhídrico al 2.5 M para medir la cantidad de antibiótico no liberado.

Para analizar el efecto del antibiótico en las propiedades del cemento, se volvió a analizar el tiempo de fraguado mediante la aguja de Vicat y las propiedades mecánicas, calculando la fuerza de tensión diametral, exactamente igual que cuando se caracterizó el material por primera vez.

Todos los resultados se procesaron mediante el programa OriginPro 8®.

Material y método

El estudio de la liberación controlada de antibiótico se realizó en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

4.2 ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ANTIBIÓTICO INCORPORADO AL CEMENTO

Para ello preparamos cilindros (N=3; 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor) de CFC y Si-CFC al 10, 20, 40 y 80% de silicio a un p/l de 1.5, las muestras se sumergieron durante 24 h en tubos de cristal con una solución de 5 y 20 mg/ml de vancomicina a 37° C y agitación de 90 rpm para la absorción del antibiótico. También se estableció un control negativo con CFC y Si-CFC al 10, 20, 40 y 80% de silicio sin incubar en vancomicina. De forma paralela, se realizó otro experimento para valorar la actividad antimicrobiana introduciendo esta vez el antibiótico en su fase sólida. Para lo cual incorporamos 100 mg de vancomicina por cada 2g de fase sólida del cemento de fosfato cálcico, siguiendo los mismos pasos que en el estudio de la liberación de antibiótico. Se preparó CFC y Si-CFC al 10, 40 y 80% de silicio a un p/l 1.5, con su correspondiente control negativo de CFC y Si-CFC al 10, 20, 40 y 80% de silicio sin vancomicina.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana de los CFC se utilizó la cepa de *Staphylococcus Aureus* ATCC 6538P, a partir de un cultivo de 24 horas en agar triptona soja, con una turbidez comparable al patrón 0,5 de la escala McFarland. Se prepararon 3 ml de *Staphylococcus Aureus* a los que se añadió 12 ml de medio líquido (dilución 1/5), obteniendo 15 ml con una turbidez de 0.1 de la escala de McFarland y se les incorporó 600 ml del medio de cultivo Antibiótico Medio nº 8 (Laboratorios BioCult, Ref: MD231), lo que corresponde a 3 ml por cada 120 ml según el artículo de Obadia et al. del 2003 ^[151], dicha suspensión se llevó a 50° C. Esta solución se utilizó para rellenar placas de Petri estériles, poniendo 25 ml por placa y dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Una vez que la suspensión alcanzó la temperatura ambiente, se realizó un defecto de 10 mm de diámetro, en el centro de cada placa, que recibió el cilindro del cemento, el experimento se realizó por triplicado. Se estableció como control una placa inoculada a la que no se le incorporó el cilindro de CFC y dos placas con un disco de

Material y método

vancomicina (30 µg), para verificar la sensibilidad de la cepa. Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas antes de su incubación a 37° C durante 24 horas, periodo máximo de reactividad entre los microorganismos y el efecto inhibidor del antibiótico (Figura 11).

Con una cámara digital y objetivo macro se obtuvieron fotografías de todas las placas Petri del estudio y las imágenes se procesaron mediante el programa Image Tools®. Se realizaron 30 mediciones por halo, con lo que se determinaron los diámetros medios de inhibición de cada muestra. Se calculó la media \pm DE para los valores obtenidos de cada muestra mediante el programa OriginPro 8®.

El estudio de la actividad microbiana se realizó en el Departamento de Química-Física II junto con la colaboración del departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

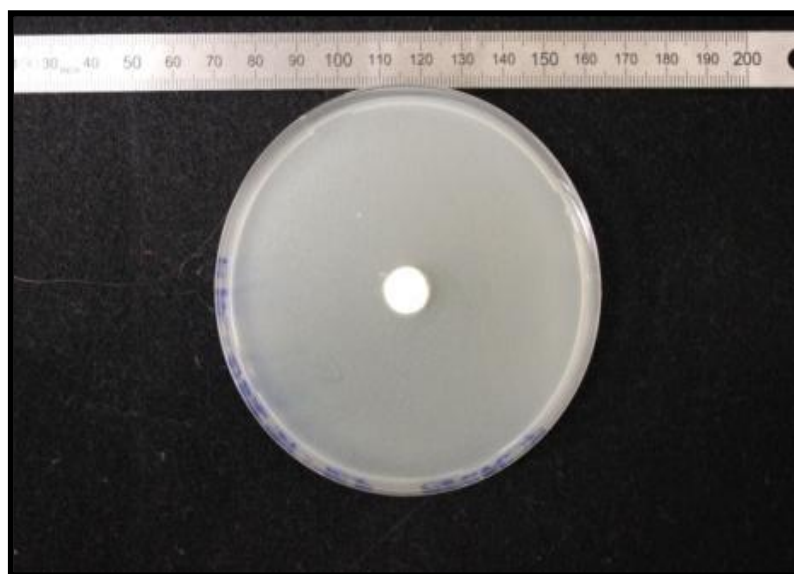


Figura 11. Imagen del cultivo de *Staphylococcus Aureus* sobre una placa petri, con una pastilla de CFC en el centro, alrededor de ella se formara el halo de inhibición.

5. ESTUDIO IN VIVO DE REGENERACIÓN ÓSEA

Antes de comenzar el estudio animal *in vivo*, el Comité Ético para la Experimentación con Animales aprobó el protocolo de dicho estudio. Los experimentos

Material y método

se realizaron de acuerdo con las pautas del Consejo Directivo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC) y se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el daño y molestias a los animales.

Para el procedimiento quirúrgico se seleccionaron 9 conejos hembras de raza Nueva Zelanda de 6 meses, cuyos pesos oscilaban entre 3400 y 3000 gramos en el momento de la cirugía. Los animales permanecieron en el animalario oficial para ensayos animales de la universidad Rey Juan Carlos de Madrid a 22-24° C, con un 55-70% humedad, ciclos de luz de 12 horas y renovación de aire cada 15 minutos.

Preparación del material:

Los cementos para el procedimiento *in vivo* se prepararon en forma granulada, utilizando 5 g de fase sólida que se mezclaron con ácido cítrico al 1M. Los materiales de cemento de fosfato cálcico seleccionados para el experimento fueron CFC como control positivo y Si-CFC al 10, 20, 40 y 80 % de silicio, cada cemento se preparó con el porcentaje p/l más adecuado para cada material, oscilando de 1,5 a 3 g.ml⁻¹. Una vez fraguada la mezcla entre la fase sólida y líquida se dejó secar en una placa de vidrio, posteriormente se molió el cemento en un mortero de vidrio y se pasó por un tamiz hasta obtener gránulos con un diámetro de 0,5-0,8 mm. La preparación de las muestras se realizó en condiciones asépticas, desinfectándose en 70% etanol durante 60 minutos. A continuación se dejaron secar debajo de una campana de flujo a temperatura ambiente y se introdujeron en recipientes estériles sellados herméticamente hasta el momento de la cirugía.

El material para el estudio *in vivo* se preparó en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Procedimiento quirúrgico:

Se anestesiaron los conejos con dosis intramuscular de 35 mg/kg de Ketamina (Imalgene®; Merial) y 5 mg/kg de Xilacina (Rompun®; Bayer). Treinta minutos antes de la anestesia se administró 0,2 ml de Buprenorfina (Buprex®; Bayer) como analgésico. Tras rasurarles la región craneal se les aplicó povidona iodada antes de realizar una incisión medial sobre la calota, de unos 6 cm de longitud con bisturí nº 15. Mediante un despegamiento mucoperióstico se expusieron los huesos parietales del

Material y método

conejo, donde se realizaron dos defectos óseos, uno a cada lado de la sutura media. Los defectos se marcaron mediante una trefina de 10 mm de diámetro ^[153] y fueron realizados a espesor total de la calota (Figuras 12 y 13). El despegamiento del hueso se realizó con sumo cuidado tratando de no dañar las meninges y evitar hernias (Figura 14). Los defectos de cada conejo se rellenaron con distintos materiales (Figura 15) de forma aleatoria, operándose un total de 9 conejos. Se estableció un control negativo en el que no se rellenó el defecto óseo para valorar la regeneración ósea espontánea. La herida se suturó por planos, suturándose primero el periostio con ácido poliglicólico (Dexon II® 4/0), asegurándonos de la estabilidad del material. Y posteriormente cerramos completamente con sutura monofilamento de seda 3/0 (Apósitos Sanitarios Aragoneses) como muestra la Figura 16. Tras la cirugía se administró Atipamezol (Antisedan®) como reversor anestésico de la Xilacina en una dosis de 1 mg/Kg por vía subcutánea. Para el control del dolor e infección se administró a los conejos tratamiento antibiótico en el agua de beber (Terramicina®) y analgésico Buprenorfina (Buprex®) 0,2 ml cada 6 horas durante 3 días.

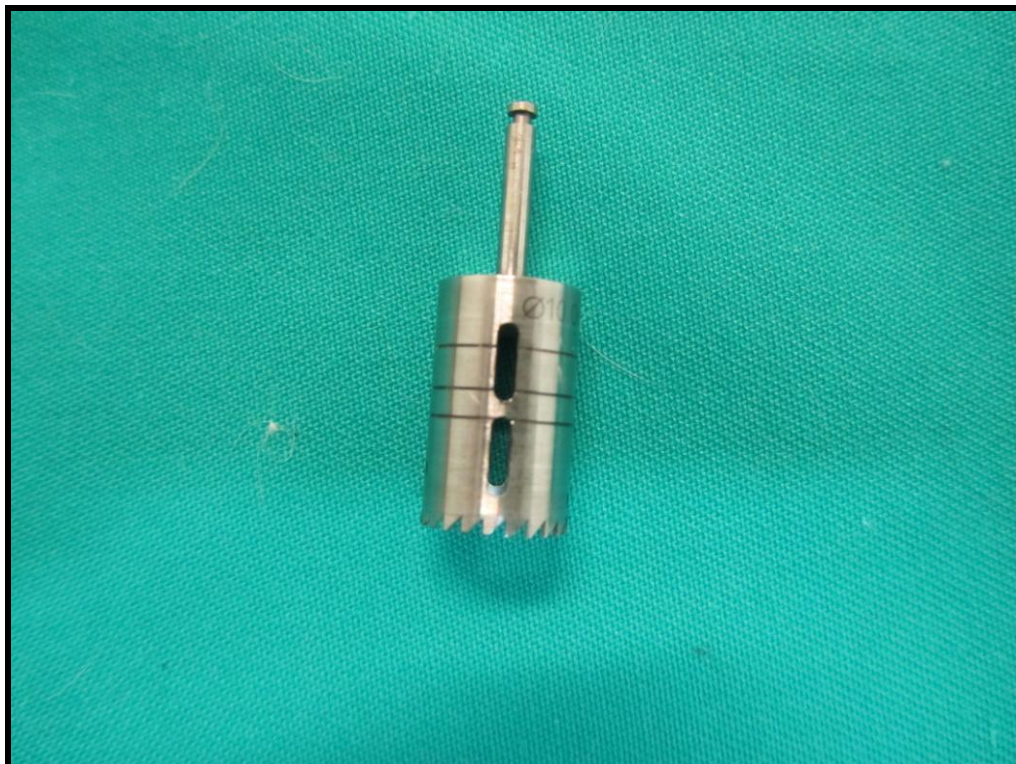


Figura 12. Imagen de la trefina.



Figura 13. Imagen de la trefina y del hueso extirpado para crear los defectos óseos.

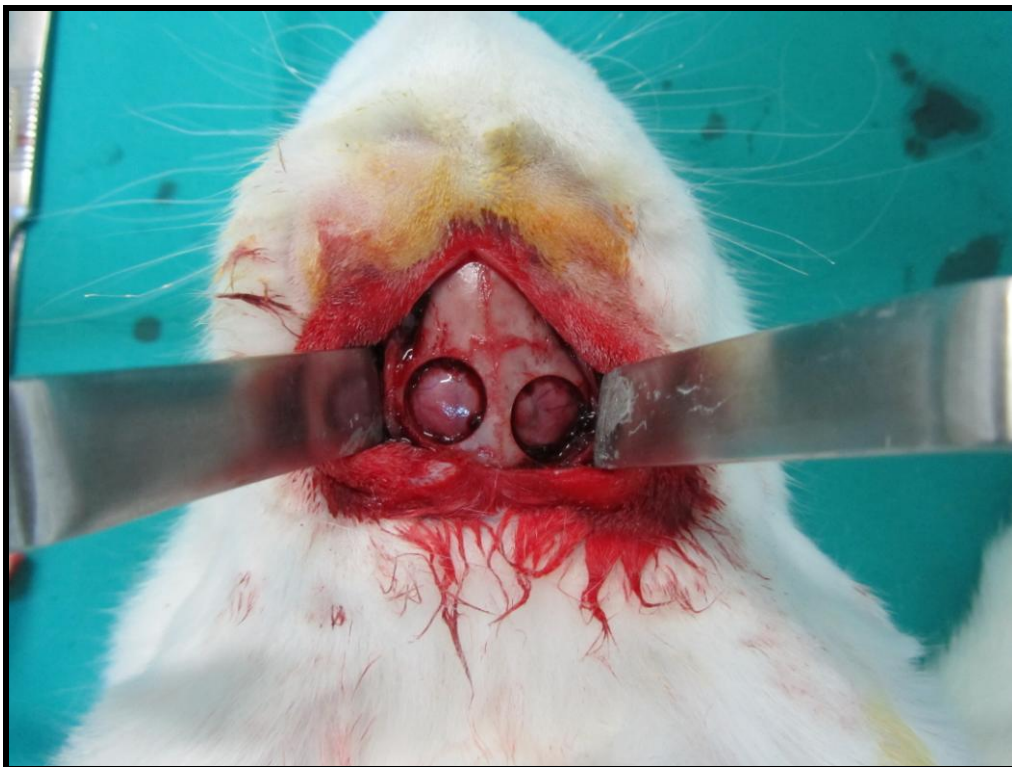


Figura 14. Imagen de los defectos en la calota del conejo durante la intervención.



Figura 15. Imagen del relleno de ambos defectos con el CFC.



Figura 16. Imagen de la sutura final con hilo de seda (3/0).

Material y método

Tras pasar 8 semanas se procedió a su sacrificio, no presentando ninguno de los conejos ninguna complicación post operatoria. El sacrificio se realizó mediante sobredosis de pentobarbital sódico IV (Euta-Lender®) y se extrajeron los fragmentos óseos de la calota, que contenían el defecto óseo, mediante pieza de mano y fresa quirúrgica de carbono de tungsteno.

El procedimiento quirúrgico del estudio *in vivo* se realizó en el animalario y el departamento de Estomatología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Juan Carlos I de Madrid.

Preparación de las muestras:

Una vez extraídos los fragmentos óseos, las muestras se introdujeron en una solución de formaldehído tamponado al 10% (pH 7.4) para su fijación. Y se mantuvieron en la nevera durante 7 días. Después se recortaron para que tan solo contuvieran la zona regenerada con nuestro material, desechando el resto de tejido que no se iba a estudiar. Se introdujo cada muestra en un cestillo y se etiquetó. Antes de deshidratar las muestras se lavaron con agua durante unos segundos, para eliminar el exceso de formol. Las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en una graduación creciente de alcoholes 70, 80, 90 y 100%, dejando 7 días las muestras en cada concentración de alcohol. Una vez terminada dicha secuencia, se introdujo cada muestra en Technovit® 7200 VCL (Exact®) al 50% con alcohol absoluto en el desecador haciendo el vacío. Se realizó el mismo proceso con el 75 y 100% de Tecnovit®, dejando pasar 7 días en cada uno. Después se introdujeron las muestras en unos moldes cubiertos con Tecnovit®, y se polimerizaron con luz halógena blanca durante 24 horas. También se polimerizaron con luz UV azul durante 30 minutos. Se realizó el pulido de cada bloque de metacrilato con discos de 800, 1200 y 2000 y se fijaron en los portas mediante adhesivo. Se obtuvieron secciones 200 µm de espesor con el micrótopo Remet (Bologna, Italia) y posteriormente se redujeron hasta unas 80 µm con la pulidora LS2 Remet (Bologna, Italia). Por último se tiñeron con azul de toluidina a un pH de 2.40.

Las muestras se procesaron en el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Estudio histológico e histomorfométrico:

La evaluación histológica del hueso neoformado se realizó por medio del microscopio óptico invertido Nikon Eclipse Ti-microscope (Japón). Para el análisis histomorfométrico, se capturaron imágenes de las muestras magnificadas de 2x mediante una cámara digital asociada al microscopio Nikon (Japón). Las imágenes se analizaron mediante el programa Nis-Elements versión 3.00, midiéndose el área total del defecto, el hueso neoformado y el CFC remanente.

Se calculó la media y la DE de la cantidad de hueso neoformado y la cantidad de material remanente. Se realizó primero el test de Shapiro-Wilk para comparar si se cumplían los criterios de normalidad para todas las variables, después se analizó el significado estadístico aplicando el análisis de variancia ANOVA de un factor utilizando el programa OriginPro 8®. A posteriori, se realizó el test post hoc de Tukey ($P < 0.05$).

El estudio histomorfométrico de las muestras se realizó en el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid

VIII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

1.1 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

1.1.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS-X Y ANÁLISIS DE RIETVELD

El componente principal de las cerámicas sin dopar fue el β -TCP, que muestran picos característicos a valores 2θ de 21,82, 25,78, 27,78, 29,61, 31,00, 32,44, 33,03 y 34,36° (Figura 17). Al incorporar el silicio en las cerámicas, además de los picos característicos del β -TCP, se encontraron nuevos picos de difracción (Figura 17). Estos picos corresponden a la silicocarnotita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) o fosfato de silicato cálcico, lo que implica la formación de este nuevo compuesto respecto a las cerámicas sin dopar. En las cerámicas dopadas al 20% de silicio se localizó la silicocarnotita a valores 2θ de 22,73, 27,09, 28,92, 30,19 y 31,73°. La intensidad de estos picos aumentaba, cuanto mayor era el contenido en silicio, llegando a ser la silicocarnotita la fase mayoritaria en las cerámicas con un contenido de silicio $\geq 40\%$.

Los patrones de difracción de las cerámicas dopadas con silicio, se caracterizaron por un desplazamiento de los picos correspondientes a la fase del β -TCP hacía ángulos de difracción más bajos, al compararse con las cerámicas sin dopar, lo que indica un mayor tamaño de la celdilla del cristal del β -TCP, probablemente por la presencia de iones de silicato en el cristal del β -TCP. Esto es debido a que la longitud del enlace Si-O (0,161 nm) es mayor que la del enlace P-O (0,155 nm), haciendo que el radio iónico del grupo fosfato (PO_4^{3-}) es menor que el grupo silicato (SiO_4^{4-}) [154].

El β -TCP y el Si-TCP se mezclan con MCPM y con agua destilada para formar un cemento cálcico. La reacción de fraguado entre el β -TCP y el MCPM, da lugar a un cemento cuya matriz está compuesta principalmente por brushita y restos de β -TCP no reaccionado. El análisis de los patrones de difracción de rayos X de los cementos dopados con silicio fue complejo, ya que se hallaron fases cristalinas y amorfas (Figura 18).

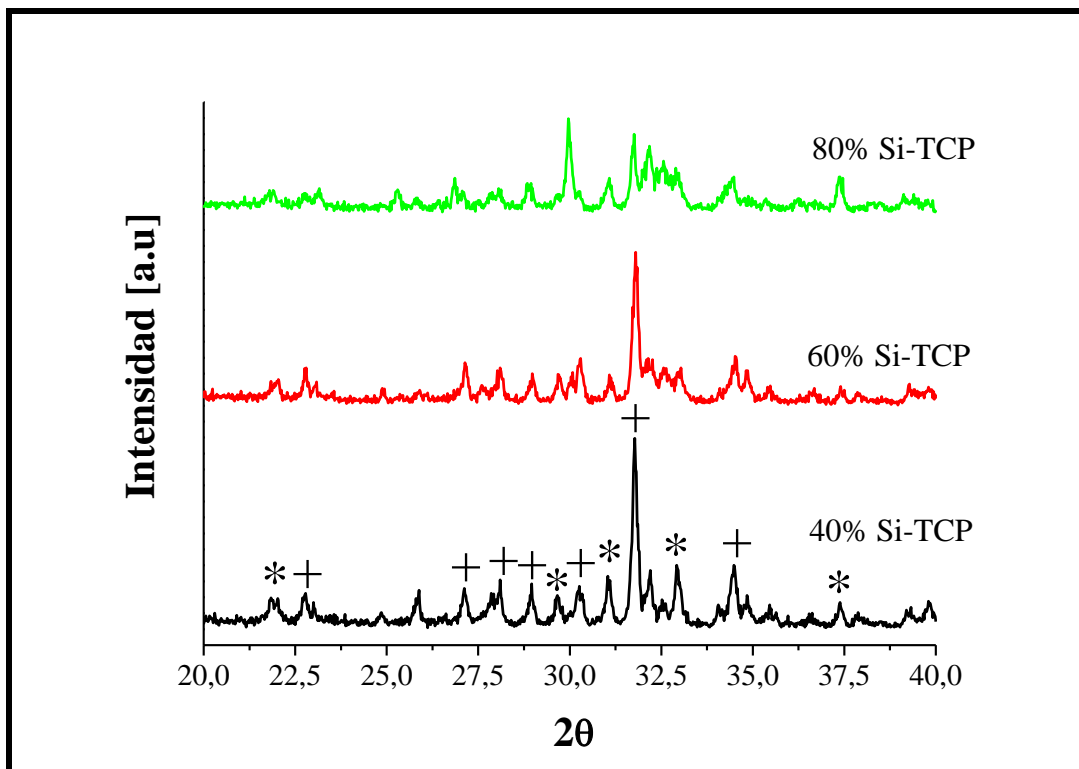
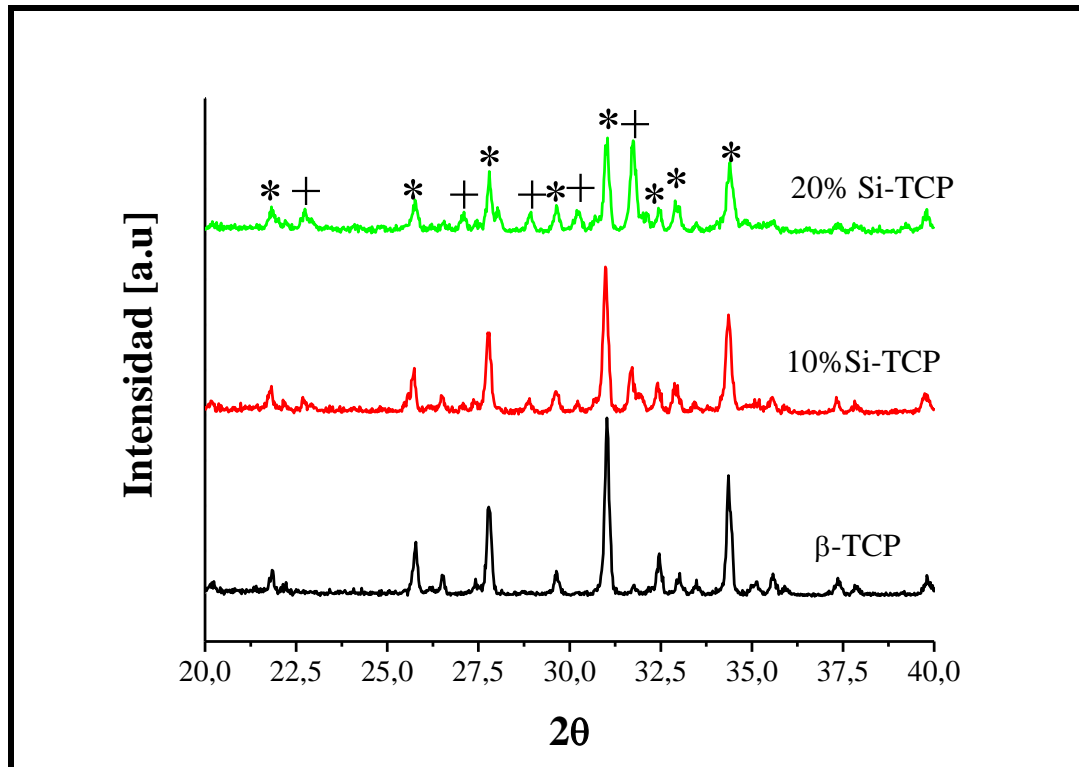


Figura 17. Patrones de difracción de rayos X del sintetizado de las cerámicas con contenido en Si entre un rango del 0 al 80%. Se han marcado los picos principales de la siguiente manera: β -TCP (*) y silicocarbonita (+).

Resultados y discusión: Caracterización del material

En todos los cementos dopados con silicio se identificó a la brushita, siendo la fase mayoritaria en aquellos cementos con un contenido en silicio $\leq 40\%$. Se observaron los picos de difracción característicos de brushita a valores de 2θ a 11,60, 20,92, 29,25, 30,50, 34,10, 34,38 y 37,11° para los cementos dopados entre 10 y 40% de silicio. Sin embargo, la intensidad de estos picos fue disminuyendo en aquellos cementos con un contenido en silicio mayor al 40%. Los picos de difracción de la brushita sufrieron un desplazamiento hacia ángulos más bajos, cuando se comparaban con la brushita del cemento no dopado, lo que indicaba un aumento en el tamaño de la celdilla del cristal de brushita. Esto se verificó mediante el análisis de Rietveld, que mostró un aumento en el volumen de la celdilla del cristal de la brushita al aumentar el contenido de silicio (Figura 19). El análisis EDX de los cristales de la matriz de cemento, detectó la presencia de iones de silicio en cristales individuales con una relación $\text{Ca}/[\text{P}+\text{Si}]$ en torno a 1, que es característica de la brushita (Tabla 6). Todos estos resultados apoyaron la incorporación de iones de silicio en el cristal de brushita.

Tabla 6. *Análisis EDX de los CPC sustituidos con silicio.*

CPC	Ca(%)	Si(%)	P(%)	(Ca/[Si+P])	(Si/[Si+P])	Fórmula
20%Si-TCP	17,96	0,23	11,47	1,54	1,97%	$\text{Ca}_3(\text{P}_{0.98}\text{Si}_{0.02}\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	12,70	0,40	11,64	1,05	3,32%	$\text{CaHP}_{0.97}\text{Si}_{0.03}\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
60%Si-TCP	16,02	0,52	10,20	1,49	4,85%	$\text{Ca}_3(\text{P}_{0.95}\text{Si}_{0.05}\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

También se identificó en los cementos dopados con silicio la presencia de HA, al aumentar el contenido de silicio aumentó la intensidad de sus picos de difracción. Otras fases identificadas fueron la monetita, restos de β -TCP no reaccionado y silicocarnotita como muestra la Figura 18.

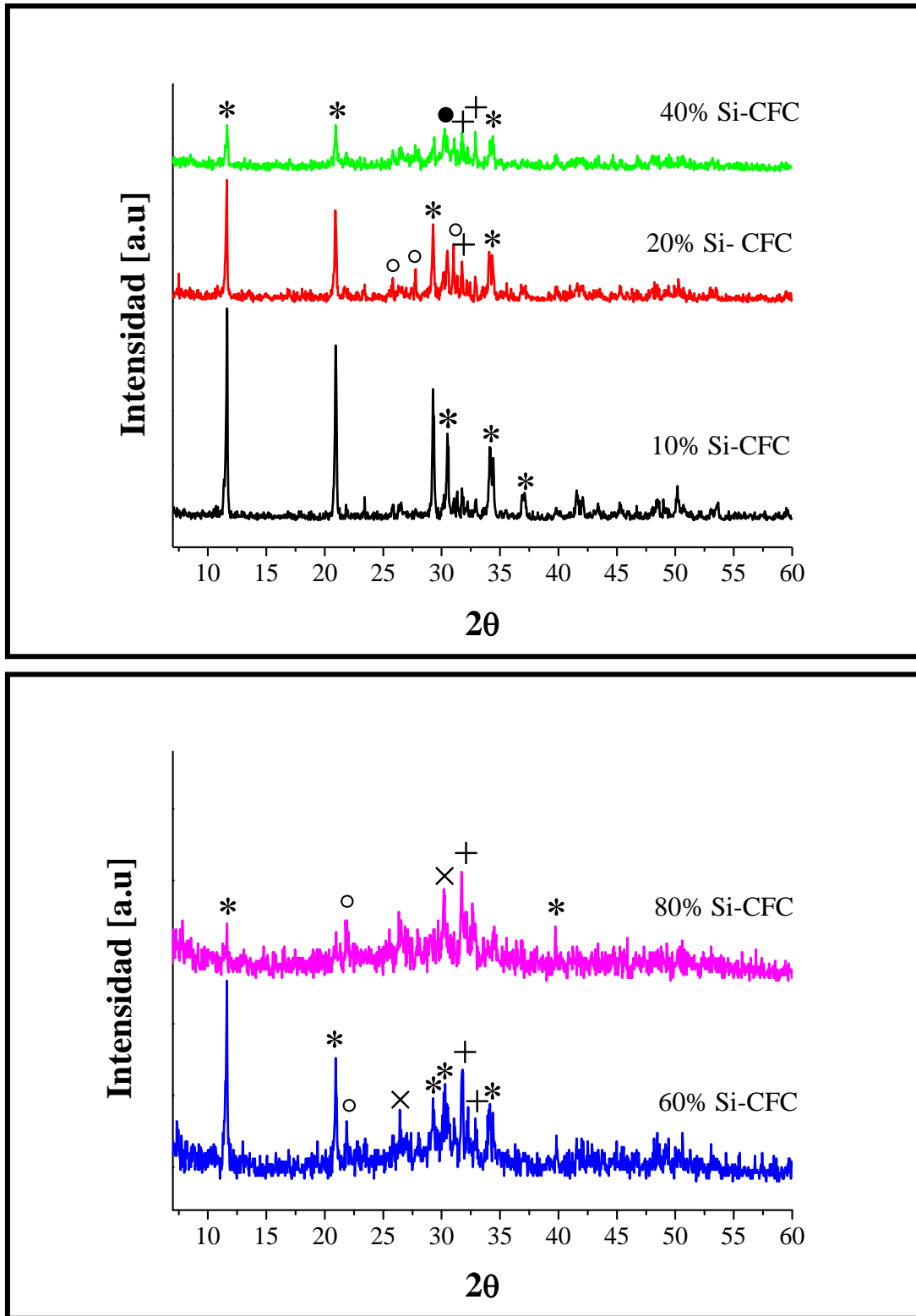


Figura 18. Patrones de difracción de rayos X de los cementos preparados con un contenido en Si en el TCP entre un rango del 10 al 80%. Se han marcado los picos principales de la siguiente manera: brushita (*), HA (+), β -TCP sin reaccionar (°), silicocarbonita (•) y monetita (×).

Hay que destacar la presencia de un halo centrado en 2θ cerca de 30° , en los cementos preparados con un contenido de silicio $\geq 20\%$, que puede indicar la formación de una fase amorfa de silicato cálcico ($\text{Ca}_x(\text{SiO}_4)_y$). Se ha descrito que el patrón de difracción de rayos X de silicato cálcico hidratado (C-S-H) está centrado en $2\theta = 29,5^\circ$, lo que parece indicar la formación de C-S-H en la matriz de los cementos dopados con silicio. En nuestro caso esto se demostró mediante el análisis FTIR, como veremos más adelante.

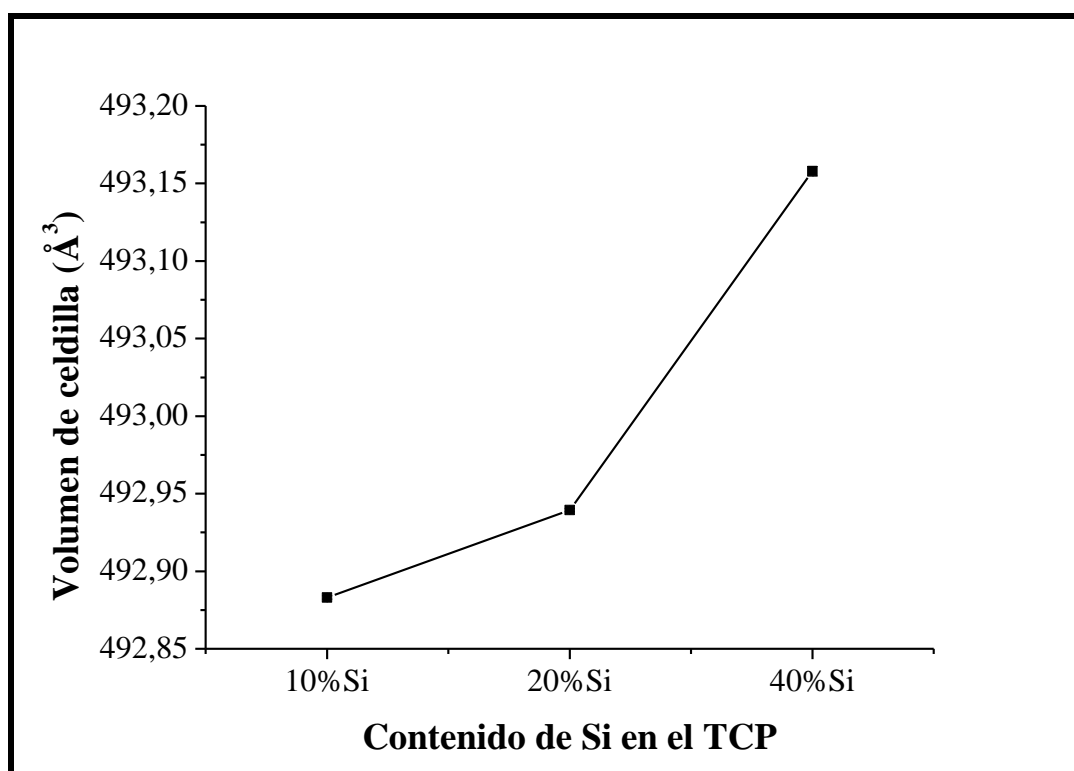


Figura 19. Efecto de los iones de silicio en el volumen de celdilla del cristal de brushita.

1.1.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS

La composición de los cementos dopados con silicio se corroboró mediante el análisis FTIR (transformada de Fourier de espectros infrarrojos) (Figura 20). En los cementos preparados al 40% de silicio se determinó la presencia de hidroxiapatita, gracias a la existencia de bandas de vibración a 599 , 628 , 921 y 960 cm^{-1} , y la de C-S-H se caracterizó mediante bandas de vibración a 844 y 944 cm^{-1} . Cabe destacar el hallazgo de una banda situada a 474 cm^{-1} que podría asignársele a bandas de P-O de la HA o Si-

O del C-S-H. Las bandas de vibración de los grupos de PO_4^{3-} de la HA, situados entre $960\text{-}1096\text{ cm}^{-1}$, estaban ausentes en el espectro de FTIR de los cementos dopados entre el 20% y el 80% de silicio. Mientras que las bandas de vibración de los grupos SiO_4^{4-} , estuvieron presentes a $473, 844$ y 943 cm^{-1} en todos los cementos dopados.

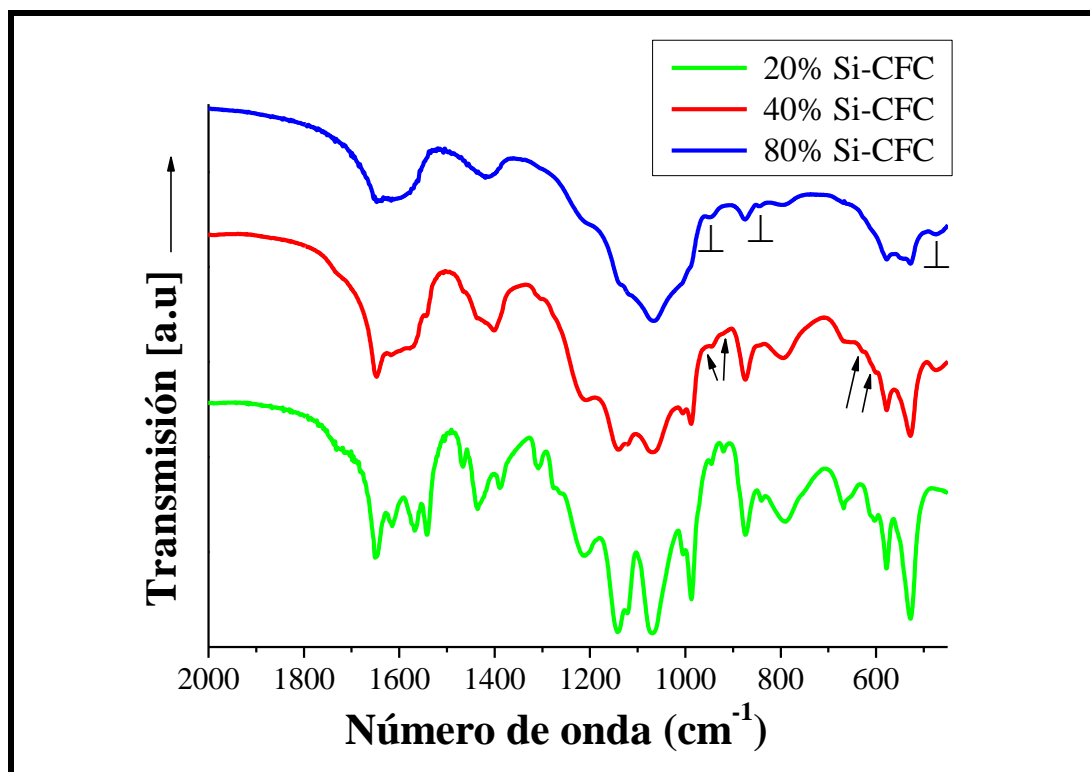


Figura 20. Espectro FTIR de los Si-CFC al 20, 40 y 80%, donde las bandas de vibración de la HA están marcadas con una flecha y las de C-S-H con una T invertida.

1.1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El análisis de la matriz de los cementos mediante SEM, reveló cambios en la morfología cristalina inducidos por el aumento en el contenido de silicio. La matriz de los cementos de brushita sin dopar, se compone de cristales con forma de placa, con dos tamaños principalmente, uno a $2,3 \pm 0,5\text{ }\mu\text{m}$ y otro a $1,0 \pm 0,3\text{ }\mu\text{m}$. Al añadir el silicio en la composición de los cementos fueron aparecieron cristales con formas más redondeadas, así los cementos preparados con 20% Si-TCP, se componían principalmente, de pequeños cristales con forma de placa ($0,9 \pm 0,2\text{ }\mu\text{m}$) como puede verse en la Figura 21 y otros cristales redondos más grandes ($1,4 \pm 0,3\text{ }\mu\text{m}$) (Figura 22). Al aumentar el contenido en silicio cambió considerablemente la estructura de los

cementos, como puede apreciarse de la Figura 23 a la 28, ya que aumentó el número de cristales redondos a expensas de los cristales en forma de placa. Un dato interesante es la aparición de estructuras tridimensionales, en los cementos dopados al 60 y 80% de silicio como muestran las Figuras 23, 24 y 25. En la Figura 25 puede observarse una estructura parecida a un tubo, de $73 \pm 2 \mu\text{m}$ de longitud y $13,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de diámetro, con un mayor aumento se aprecia que dicha estructura está formada por nanocristales redondos con un promedio de diámetro de $160 \pm 20 \text{ nm}$ (Figura 26). En ocasiones los cristales adquirirían formas irregulares de aspecto cuadrangular con bordes redondeados como se observa en los cementos dopados al 80% de silicio, Figuras 27 y 28.

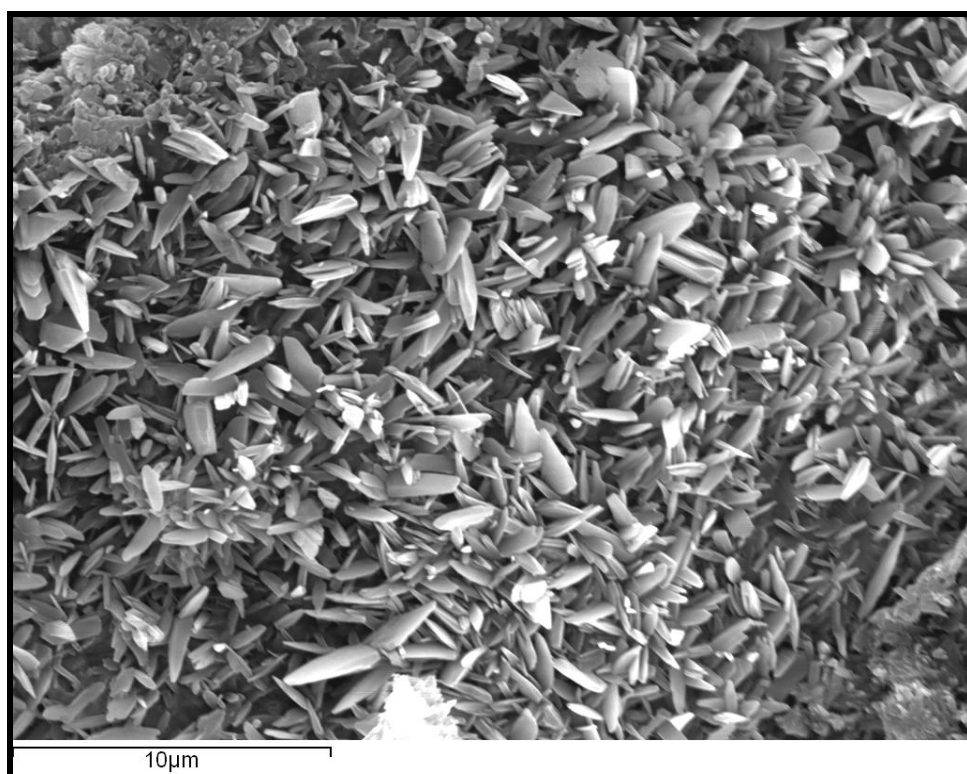


Figura 21. Imagen SEM de la superficie de 20% Si-CPC (4000X).

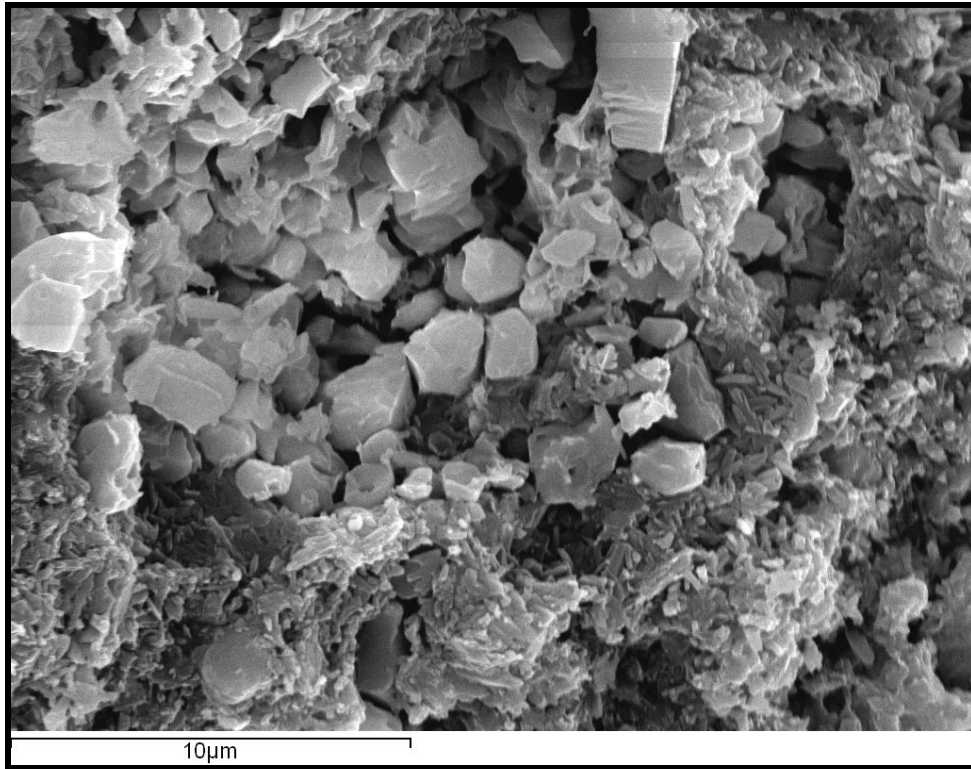


Figura 22. Imagen SEM de la superficie de 20% Si-CPC (5000X).

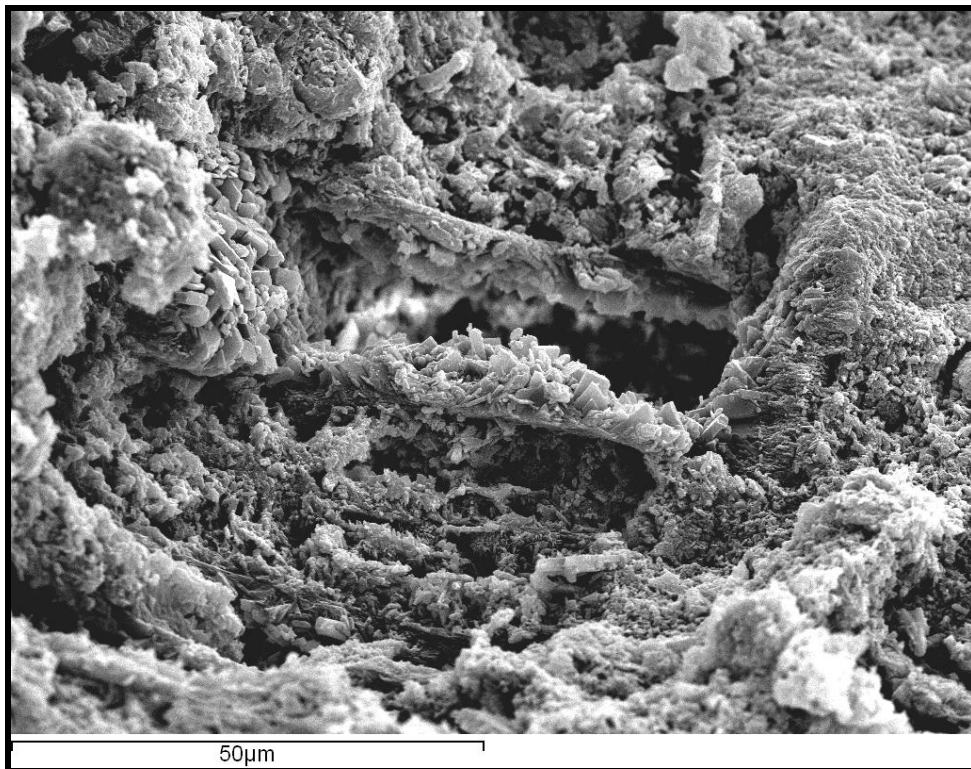


Figura 23. Imagen SEM de la superficie de 60% Si-CPC (1000X).

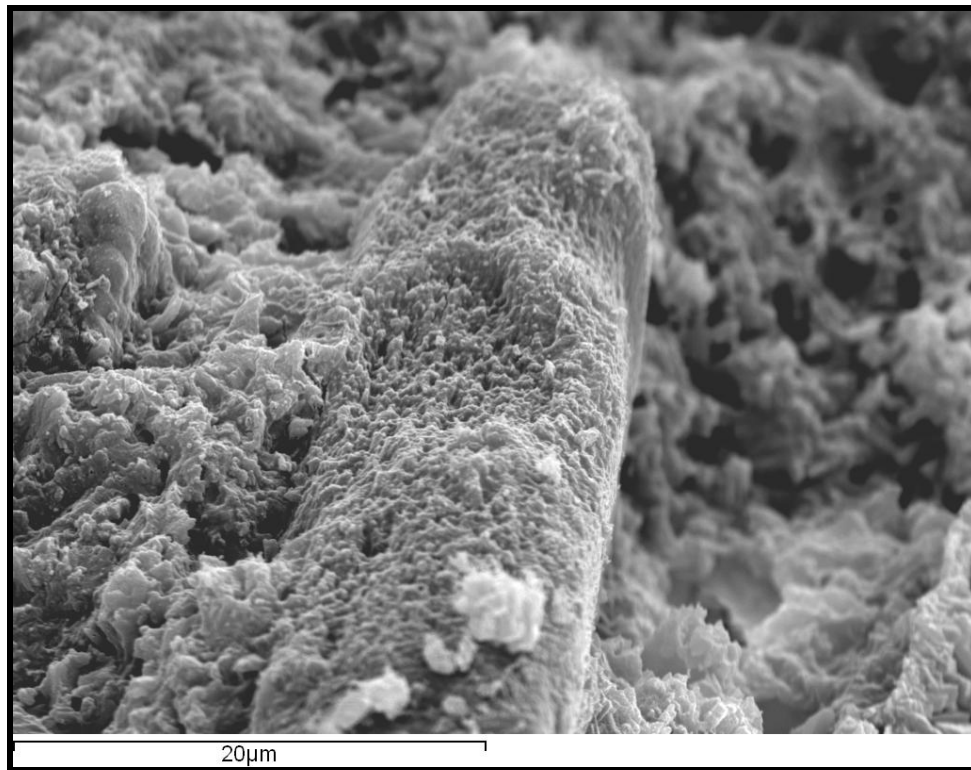


Figura 24. Imagen SEM de la superficie de 60% Si-CPC (2500X).

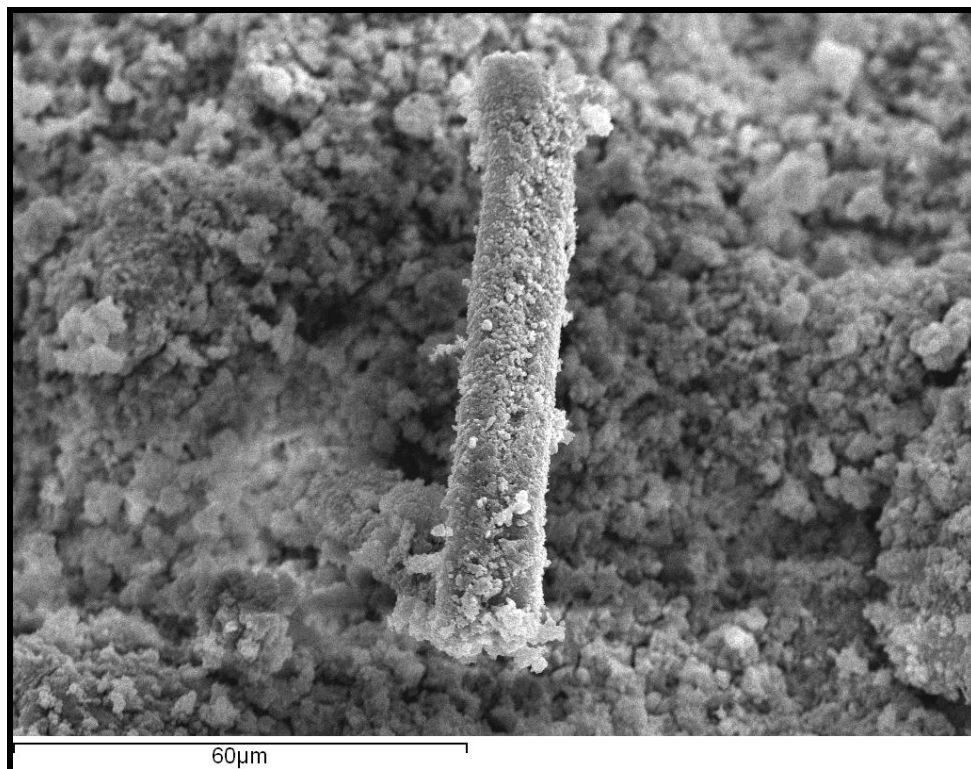


Figura 25. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC (800X).

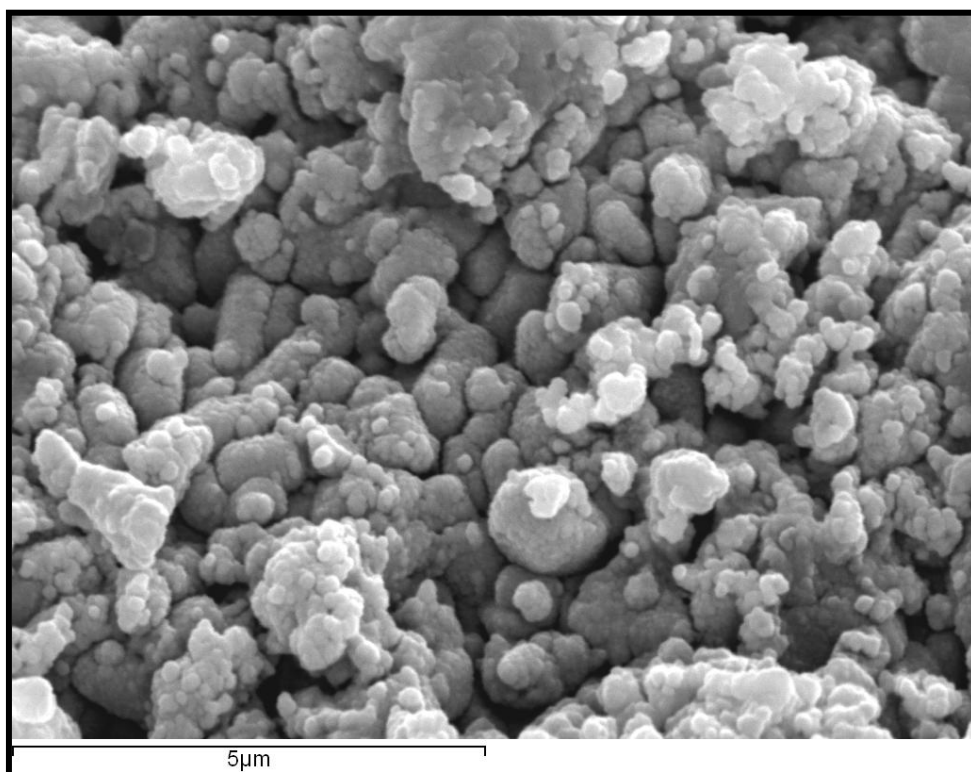


Figura 26. Imagen SEM la superficie de 80% Si-CPC (10000).



Figura 27. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC (2500X).

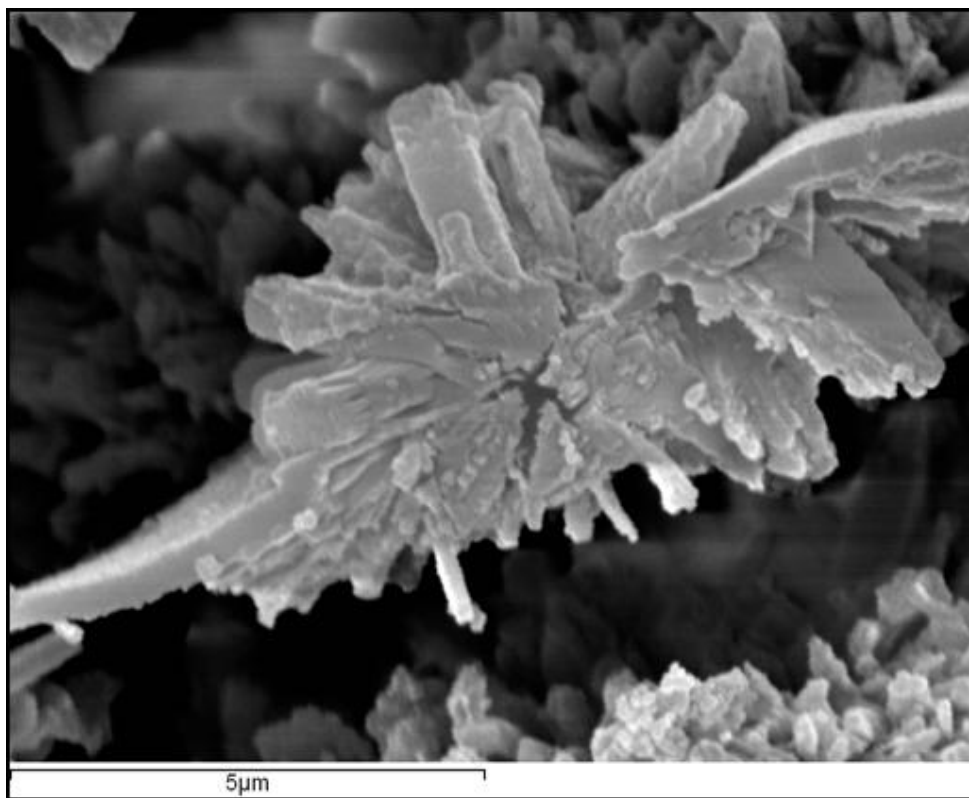


Figura 28. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC (10000X).

1.1.4 DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE FRAGUADO

Cuando se utilizó agua, ácido tartárico o ácido glicólico como fase líquida del cemento, al mezclarse con la fase sólida, fraguaba de forma tan rápida que impedía la producción de las pastillas cilíndricas que se utilizan para estudiar sus propiedades. El problema se resolvió empleando ácido cítrico 1M como fase líquida y modificando la relación polvo-líquido (p/l). Los tiempos de fraguado oscilaron entre 25 y 30 minutos para los cementos preparados con β -TCP sin sustituir, a una relación p/l de 2.5 g.ml^{-1} , mientras que los cementos con el 10% de silicio y la misma relación p/l tardaron 5 minutos en fraguar. El tiempo de fraguado se redujo a 1 minuto 40 segundos cuando se utilizaba 20% Si-CFC. Los cementos preparados al 40 y 60% de silicio tuvieron que prepararse a una relación p/l de 2 g.ml^{-1} , debido a que su manejo resultó imposible a una reacción p/l mayor, el tiempo de fraguado fue de 2 minutos 30 segundos. Por último, el cemento al 80% de silicio fraguó a los 3 minutos 30 segundos con una relación p/l de $1,5 \text{ g.ml}^{-1}$ (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del tiempo de fraguado en minutos de los cementos a distintas concentraciones de silicio (0-80%) y su proporción de p/l correspondiente a cada cemento.

Material	P/L (g.ml ⁻¹)	Tiempo Fraguado (minutos) Media ± DE
CFC	2,5	27 ± 3
10% Si-CFC	2,5	5,0 ± 0,4
20% Si-CFC	2,5	1,7 ± 0,1
40% Si-CFC	2	2,6 ± 0,3
60% Si-CFC	2	2,7 ± 0,1
80% Si-CFC	1,5	3,5 ± 0,3

1.1.5 DETERMINACIÓN DE LA FUERZA DE TENSIÓN DIAMETRAL (FTD)

El cemento de brushita no modificado con una relación p/l de 2,5 g.ml⁻¹ alcanzó una fuerza de tensión diametral (FTD) de 1,9 ± 0,2 MPa. La Tabla 8 muestra que la FTD fue aproximadamente de 3 MPa para los cementos al 10% Si-TCP, mientras que para los cementos preparados con 40% Si-TCP y 60% Si-TCP fue de 2,5 y 1,7 MPa respectivamente. Las propiedades mecánicas del cemento preparado con 80% Si-TCP descendieron hasta 0,7 MPa.

1.1.6 DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD Y ANÁLISIS BET DEL ÁREA DE SUPERFICIE ESPECÍFICA

La Figura 29 nos muestra la distribución del tamaño de poro y en la Tabla 9 se recogen los valores de la porosidad y diámetro medio de poro de cada material, todos los cilindros de cemento se prepararon a la misma relación p/l para excluir los efectos de este factor. El cemento preparado con un contenido en silicio menor o igual al 40% tenía una porosidad del 43%, este resultado descendió al 34% en los cementos preparados al 60% de Si-TCP. Y volvió a aumentar con los cementos preparados con el 80% de Si-TCP alcanzando una porosidad del 41%.

Tabla 8: Resultados de la fuerza de tensión diametral de los cementos a distintas concentraciones de silicio (0-80%) y su proporción de p/l correspondiente a cada cemento.

Material	P/L (g.ml-1)	FTD (MPa) Media \pm DE
CFC	2,5	1,9 \pm 0,2
10% Si-CFC	2,5	2,9 \pm 0,1
20% Si-CFC	2,5	1,3 \pm 0,2
40% Si-CFC	2	2,5 \pm 0,4
60% Si-CFC	2	1,7 \pm 0,4
80% Si-CFC	1,5	0,7 \pm 0,1

Al elevar el contenido de silicio, el promedio del diámetro del poro cambió de escala micrométrica a nanométrica. El mayor diámetro medio de poro que se obtuvo fue de 1,73 μm , que correspondía a los cementos preparados con el 20% de Si-TCP. Mientras que el menor fue de 20 nm, con cementos preparados con el 60% Si-TCP. La distribución del diámetro de poro de los cementos preparados al 20% Si-TCP muestra múltiples picos, el de mayor intensidad a 0,42 μm y los de menor intensidad a 3, 9 y 109 μm . Los cementos preparados con 40 y 60% Si-TCP, obtuvieron una distribución de poro similar, situándose el pico de mayor intensidad a 0,15 μm y el de menor a 215 μm . La distribución del diámetro de poro de los cementos preparados con 80% Si-TCP se centró en 0,82 μm el pico de mayor intensidad y 215 μm el menor (Figura 29).

El área específica de los cementos preparados al 10 y 20% Si-TCP fue de $3,14 \pm 0,04$ y $4,92 \pm 0,02 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ respectivamente. Estos valores se elevaron en los cementos al 40 y 80% Si-TCP, obteniéndose valores de $15,8 \pm 0,1$ y $28,7 \pm 0,1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ respectivamente. Lo que supone un aumento notable del área específica de los cementos dopados, en comparación con los no dopados, cuyos valores se situaron en $3,39 \pm 0,01 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultado de la porosidad, diámetro medio de poro medio y área específica de superficie para CFC y Si-CFC al 10, 20, 40 y 80%.

Material	P/L (g.ml-1)	Porosidad-Hg (%)	Diámetro medio de poro (4V/A) (μm)	Área de superficie específica BET (m^2/g)
CFC	3	44	0,63	5,10
10% Si-CFC	1,5	-	-	$3,14 \pm 0,04$
20% Si-CFC	1,5	41	1,7250	$4,92 \pm 0,02$
40% Si-CFC	1,5	43	0,0481	$15,8 \pm 0,1$
60% Si-CFC	1,5	34	0,0203	-
80% Si-CFC	1,5	41	0,0368	$28,7 \pm 0,1$

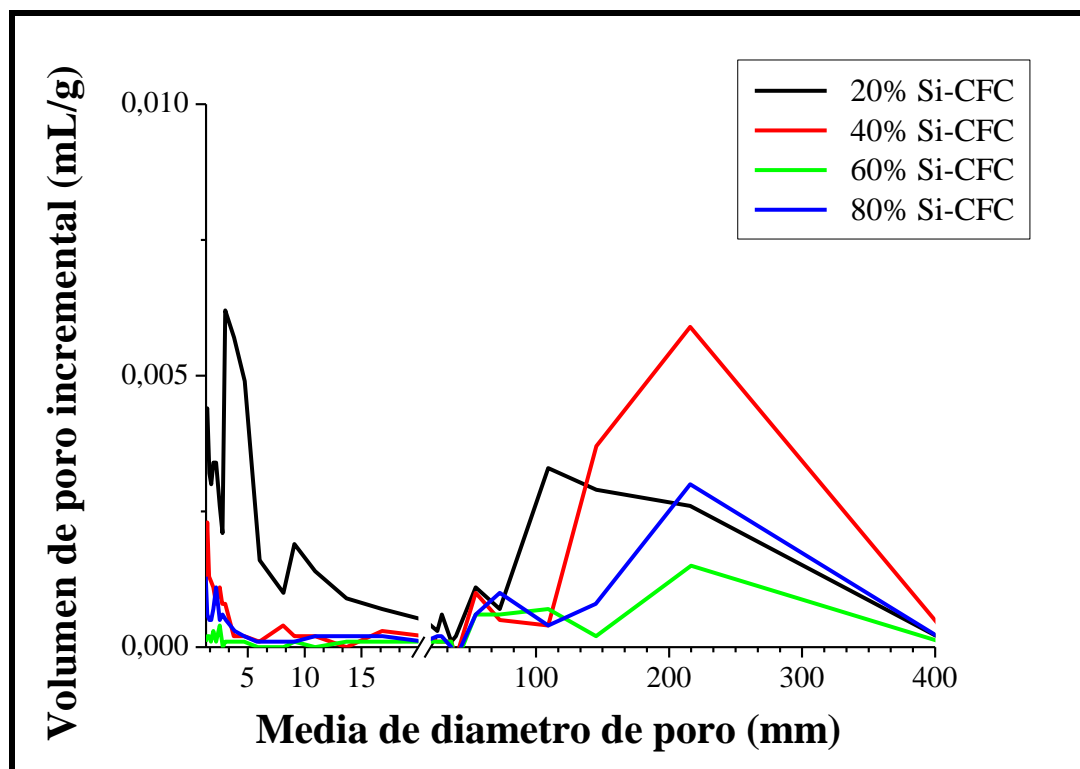
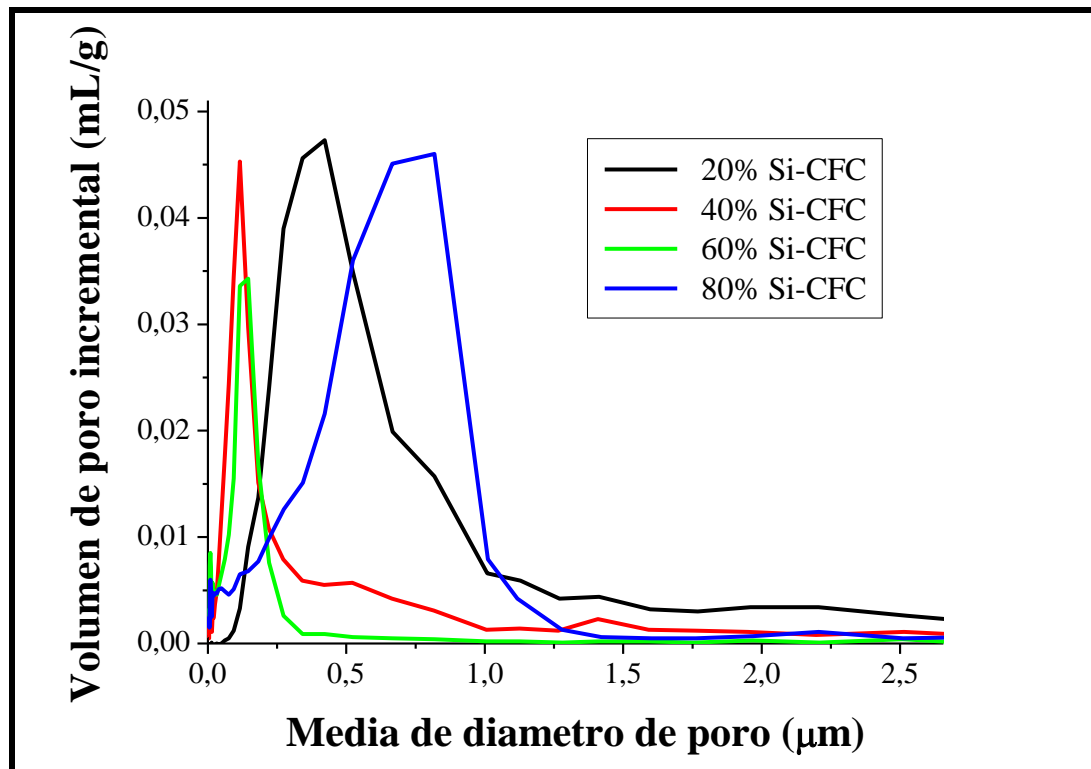


Figura 29. Distribución del tamaño de poro en los cementos preparados con Si-TCP con un contenido en Si en un rango del 20-80%.

1.1.7 LIBERACIÓN DE IONES

La Figura 30 nos ofrece los resultados de la liberación de iones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y SiO_4^{4-} , de los cementos sustituidos al 40 y 80% de silicio, frente a los cementos sin dopar.

La liberación de iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , de los cementos preparados con β -TCP sin sustituir, se caracterizó por una liberación inicial elevada, de aproximadamente 1155 y 990 ppm respectivamente. Esta disminuyó a 27 y 29 ppm, después de 7 días de incubación.

Los cementos preparados al 40% de Si-TCP liberaron, durante los 2 primeros días, iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} a 38 y 4,7 ppm respectivamente. Después, su liberación se fue incrementando hasta registros 100 y 31 ppm. Mientras que los iones de SiO_4^{4-} se liberaron a 10,4 ppm, durante los 2 primeros días. A partir del 4º día de incubación, su velocidad de liberación se incrementó hasta 33 ppm y se mantuvo constante.

Los cementos preparados al 80% de Si-TCP liberaron iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , entre 20 y 2 ppm respectivamente durante los 2 primeros días. Al quinto día de incubación se incrementó y se mantuvo entre 38 ppm para los iones de Ca^{2+} y 4,5 ppm para los de PO_4^{3-} . La liberación de iones de SiO_4^{4-} fue de 10 ppm, durante los 2 primeros días, al quinto día de incubación se elevó a 41 ppm donde permaneció estable.

Los cementos de brushita sin sustituir con silicio obtuvieron un pH ácido de ca. 3,7 después de 24 horas de incubación en agua bidestilada. Este pH se elevó hasta un pH 6 después de 18 días de incubación. Sin embargo, los cementos preparados al 40% Si-TCP y 80% Si-TCP obtuvieron un pH de ca. 7,8 después de 24 horas de incubación, que fue descendiendo a un pH de 6,3 y 7 respectivamente tras 18 días de incubación (Figura 31).

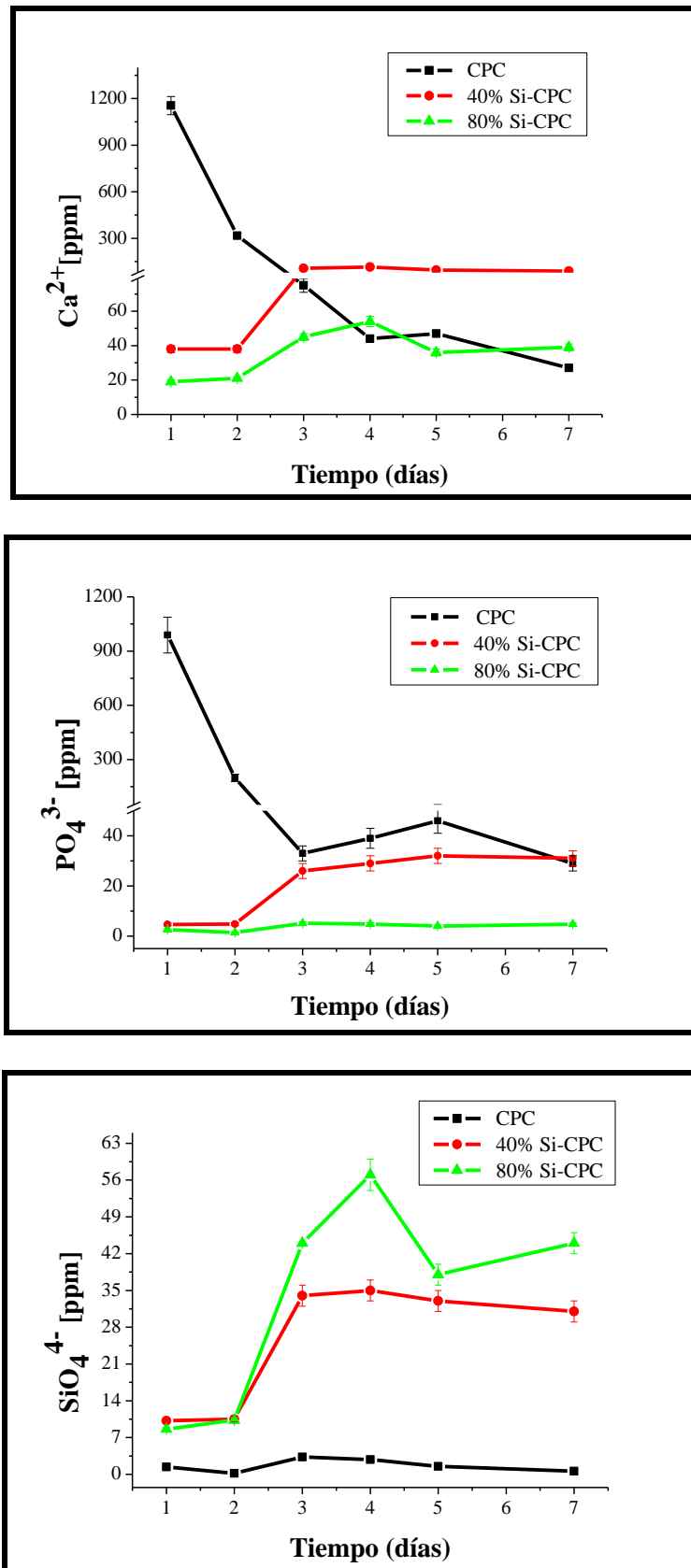


Figura 30. Liberación de iones de los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP durante 7 días cambiando el agua destilada cada 24 horas.

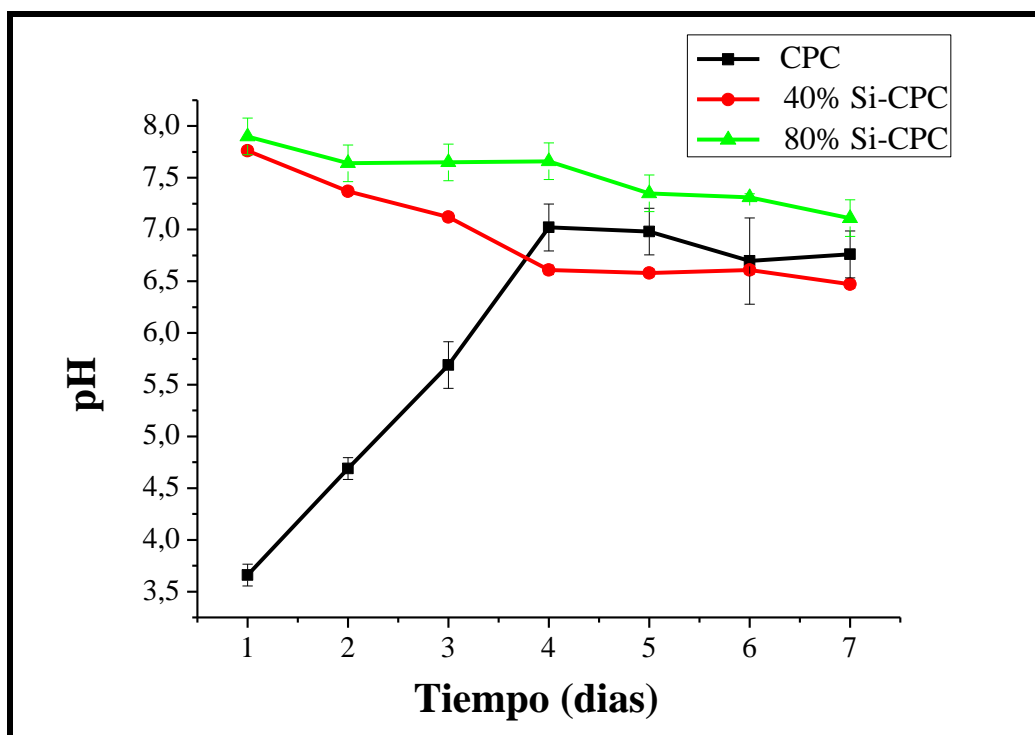


Figura 31. Cambios en el pH del agua bidestilada durante 7 días del seguimiento, de los cementos preparados con β -TCP sin sustituir, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP.

1.2. DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

La sustitución iónica juega un papel importante en la bioquímica de los sustitutos óseos, modificando algunas de sus propiedades, con el fin de mejorar la estabilidad del material, el transporte de medicamentos, la citocompatibilidad o el proceso de remodelado óseo.

El silicio es un elemento traza esencial asociado con los procesos metabólicos óseos y del tejido conjuntivo [7, 118, 119]. La bioactividad y la osteointegración de los biovidrios se producen gracias a la formación de una capa de gel de silicio en su superficie, entrando en contacto con los fluidos corporales y precipitando iones de calcio y fosfato [95]. Por ello, el silicio se ha incorporado en distintos biomateriales, como en la HA en el estudio de Hing et al. [21] o en el fosfato tricálcico- α en el trabajo de de Camiré et al. [22].

El sinterizado de nuestros reactivos a 1100° C produjo de forma satisfactoria el fosfato tricálcico- β dopado con SiO_4^{4-} . El dopaje con iones de silicio se manifestó en un

desplazamiento de los picos de difracción hacia ángulos mayores, como muestra la Figura 17, lo que sugiere la posibilidad de la inclusión de los iones de SiO_4^{4-} dentro de su estructura cristalina. La composición de las cerámicas dopadas con silicio incluyó una nueva fase cristalina, la silicocarnotita, en el patrón de difracción de rayos X, al compararse con las cerámicas sin dopar.

La silicocarnotita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)$)^[155] estuvo presente en todos los materiales que sintetizamos con silicio, siendo la fase prioritaria en aquellas cerámicas con una sustitución $\geq 40\%$ de Si, lo que dio lugar a una cerámica bifásica de β -TCP y silicocarnotita. Esta fase se ha definido en estudios anteriores^[156, 157, 158] como un silicato de fosfato cálcico con una estructura similar a la de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)^[159, 160], dónde un ion fosfato está sustituido por otro de silicato. Reid et al.^[20], la obtuvieron al sustituir cerámicas de HA con iones de SiO_4 , lo que producía la pérdida de todos los grupos OH de la HA, considerando a la silicocarnotita como una mezcla de apatita deshidratada sustituida con silicio y oxiapatita. También hace referencia a este compuesto Ruys et al.^[161], sugiriendo que podía estar presente como una fase impura en la HA sustituida a bajas concentraciones de SiO_2 .

El análisis de los patrones de difracción de rayos X de los cementos dopados con silicio (Figura 18) mostró, que la matriz de estos cementos se compone de elementos cristalinos y otros amorfos. La presencia de un halo centrado a un 2θ cerca de 30° ^[162], puede indicar la presencia de una fase amorfa de silicato cálcico hidratado (C-S-H)^[163]. Esta fase se ha descrito previamente en otros trabajos, como en los de Taylor et al.^[164] que han hecho importantes contribuciones en este campo. En una de sus publicaciones propuso un modelo nanoestructural para la obtención de C-S-H mediante el producto hidratado de los silicatos tricálcicos y dicálcicos o de las pastas del cemento Pórtland.

La brushita fue la fase predominante en los cementos preparados con un contenido de Si $\leq 60\%$. El desplazamiento de sus picos de difracción hacia ángulos menores, junto con el aumento en el volumen de la celdilla de brushita (Figura 19) y la presencia de iones de silicio, en cristales cuya relación $\text{Ca}/[\text{P}+\text{Si}]$ es de aproximadamente 1 (Tabla 6), nos sugirieron la inclusión de iones de silicio en los cristales de brushita. Por lo que utilizando las cerámicas dopadas con silicio, obtuvimos un cemento cuya matriz estaba compuesta por brushita y una fase amorfa de gel de C-S-

H. El porcentaje entre estos dos componentes estaba graduado por el contenido de silicio en las cerámicas de Si-TCP, así los cementos preparados con el 20 y 40% de Si-TCP, tuvieron un mayor contenido en brushita y menor en C-S-H que los del 80% de Si-TCP.

Además, se halló la presencia de HA en la matriz de los cementos dopados con silicio, que se incrementó al aumentar el contenido de silicio (como indica el aumento en la intensidad de sus picos de difracción en la Figura 18). La composición de los cementos dopados con silicio se corroboró mediante el análisis FTIR (Figura 20), en el que se determinó la presencia de hidroxiapatita y de C-S-H. En el estudio de Damen et al. ^[165] se sugirió que los iones de silicio favorecían la precipitación de HA antes que la de brushita.

Durante el proceso de síntesis del cemento de brushita dopado con silicio se utilizó, como primera opción, el agua destilada como fase líquida. El tiempo de fraguado fue muy breve, por lo que se obtuvo un cemento inviable, seco y granuloso. La presencia de silicato cálcico hidratado, en aquellos cementos preparados con Si-TCP, con un contenido de silicio $\geq 20\%$, posiblemente sirvió como núcleo para la precipitación de brushita y HA, contribuyendo a acortar el tiempo de fraguado del cemento ^[166, 167]. Por ello se decidió incorporar un ácido carboxílico en la fase líquida, ya que en trabajos anteriores, se ha utilizado para aumentar el tiempo del fraguado y mejorar las propiedades mecánicas del cemento ^[4]. El grupo carboxílico α del ácido orgánico se enlaza con el ion de calcio expuesto en la superficie del cristal de brushita ^[168]. Este enlace permite a los ácidos carboxílicos inhibir el crecimiento del cristal de brushita ^[112, 169, 170] y en consecuencia inhibir la reacción de fraguado del cemento, sin formar parte de su estructura ^[169]. Algunos ácidos carboxílicos como el ácido glicólico o el ácido tartárico, fallaron a la hora de formar una pasta de cemento viable. Posiblemente debido al efecto catalizador de los iones de silicio en la reacción de fraguado del cemento ^[4, 171] y a la diferencia en la potencia inhibidora de estas fases líquidas como retardantes para la reacción de fraguado ^[4]. El ácido cítrico fue el único capaz de formar una pasta adecuada al mezclarse con la fase sólida, gracias a su efecto licuefaciente.

El tiempo de fraguado se redujo 20-25 minutos, de un cemento preparado con β -TCP sin silicio a otro con tan solo un 10% de Si-TCP. Por lo que para obtener una pasta de cemento viable fue necesario, además de incorporar el ácido cítrico, disminuir la relación polvo-líquido, para poder trabajar con el resto de concentraciones de silicio en los cementos dopados (Tabla 7). La formación de la pasta dependerá tanto del porcentaje de solubilidad de los materiales, como del tamaño de los cristales ^[172]. Así los materiales que tengan un menor crecimiento de los cristales y por tanto un tamaño de los cristales menor permite que estos se empaquen más y mejora las propiedades mecánicas de los cementos de brushita ^[173].

El análisis de SEM demostró como puede verse en las Figuras de la 21 a la 28 que el Si-TCP, induce cambios morfológicos sobre la matriz de cemento, lo que afectó a las propiedades físico-químicas de este nuevo material. La morfología iba cambiando gradualmente, de un predominio de cristales de forma de placa, en los cementos sin sustituir o con baja cantidad de silicio, hacia cristales con forma redondeada, a medida que aumentaba la concentración de silicio, además el tamaño de los cristales paso de ser micrométrico a nanométrico. Curiosamente, también se distinguieron estructuras tridimensionales, en la matriz de cemento preparado con 60 y el 80% de Si-TCP, que podría estar relacionado con el auto-ensamblaje de dichos cristales nanométricos.

Estos cambios estructurales afectaron a las propiedades mecánicas del cemento, la Tabla 8 muestran que la fuerza de tensión diametral del cemento disminuyó considerablemente en aquellos cementos dopados al 80% de silicio ($0,7 \pm 0,1$ MPa), debido probablemente a la disminución en la relación polvo-líquido del cemento, el descenso del tiempo de fraguado y el cambio hacía cristales de morfología más redondeada, que impiden el entrecruzamiento de los cristales ^[115]. Sin embargo los cementos dopados al 10 y 40% de silicio obtuvieron unos resultados superiores de $2,9 \pm 0,1$ y $2,5 \pm 0,4$ MPa respectivamente, cuando se les comparaba con el cemento sin dopar ($1,9 \pm 0,2$ MPa).

La porosidad del Si-CPC se mantuvo en torno al 40%. El tamaño medio de poro oscilo entre $1,7 \mu\text{m}$ para 20% Si-CPC a 20 nm para el 60% Si-CPC, desplazándose a un rango nanométrico (Figura 29 y Tabla 9). Esto podría estar relacionado con la disminución del tamaño de los cristales y la adquisición de una morfología redondeada,

tratando ambos de mejorar el empaquetamiento de los cristales. La porosidad es necesaria para la formación de hueso, ya que permite la migración y la proliferación de los osteoblastos y células mesenquimales, así como la vascularización. Además aumenta el área de superficie y con ello la conexión entre el material y el hueso, dando una mayor estabilidad al material. El menor tamaño de poro que se requiere para la regeneración de hueso mineral es de 100 μm según el estudio de Hulbert et al. ^[174]. Estos resultados están relacionados con el sistema Haversiano, que posee un diámetro aproximado de 100-200 μm ^[175]. Sin embargo Itala et al. ^[176] obtuvieron resultados de crecimiento óseo similares en poros de 125 a 50 μm , sugiriendo que los poros menores a 100 μm no representarían un tamaño de poro crítico. La microporosidad, o aquellos poros con un tamaño $< 10 \mu\text{m}$, junto con la interconexión de los poros son esenciales para proporcionar una mayor área de superficie, que favorezca la adsorción de proteínas; así como el intercambio de iones y la formación de apatita ósea mediante procesos de disolución y reprecipitación. Por otro lado también mejoran la formación de vasos sanguíneos *in vivo*, necesarios para el mantenimiento del tejido óseo neoformado y su posterior remodelación ^[176, 177, 178].

Estos cambios morfológicos mejoraron el área superficial específica (SSA) de los cemento dopados con silicio. Aunque el SSA fue menor para los cementos preparados con 10% y 20% Si-TCP, 3,14 y 4,92 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ respectivamente, el área específica aumentó hasta valores de 15,4 y 28,7 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ para los materiales sustituidos al 40 y 80%, como puede valorarse en la Tabla 9. Este aumento del SSA en el cemento podría explicarse por la reducción en el tamaño de los cristales junto con la precipitación de HA y C-S-H, cuyas áreas específicas son mayores que la de los cristales de brushita ^[168, 179].

La precipitación de un mineral en solución acuosa ocurre cuando la solución es supersaturada con respecto a dicho mineral, y su disolución cuando la solución acuosa es subsaturada con respecto al mineral. Así, las fuerzas que controlan las reacciones de disolución y precipitación de un mineral están relacionadas con la supersaturación y la subsaturación de la solución. Ambas son definidas por el producto de la solubilidad termodinámica (pK_{sp}), que describe el equilibrio entre la fase sólida y la fase acuosa en una solución. Este proceso de disolución-precipitación continúa hasta que el pH y la

composición, llegan al punto dónde los dos compuestos se encuentran en equilibrio con la solución y ninguno precipita ^[180].

Nuestros cementos de fosfato cálcico están compuestos principalmente por brushita, este compuesto va disminuyendo a medida que incorporamos mayor cantidad de SiO₂. Para valorar los cambios que se produjeron en el producto de solubilidad de los cementos, tomaremos como referencia la brushita, teniendo en cuenta que es la sal más soluble a valores de pH mayores de 8,5 ^[181].

La liberación de iones de los cementos, se acompañó de cambios en el pH de los medios de incubación (agua bidestilada). Estos cambios en el pH podrían ilustrar, los cambios en la liberación de iones de Ca²⁺, PO₄³⁻ y SiO₄⁴⁻ (Figura 30). Los primeros días de incubación de los cementos sin sustituir, se caracterizaron por una liberación brusca de iones de iones de Ca²⁺ y PO₄³⁻ durante los tres primeros días. En los cementos dopados con Si los iones de SiO₄⁴⁻ y Ca²⁺ alcanzaron su máxima liberación el cuarto día de incubación. La liberación de iones de PO₄³⁻ fue inversamente proporcional al contenido de Si, puesto que la incorporación del silicio se basa en la sustitución de los grupos PO₄³⁻ por los de SiO₄⁴⁻ como ya hemos mencionado anteriormente ^[20, 21].

El pH de estos cementos sin dopar fue ácido, de 3,7 el primer día, este valor fue aumentando progresivamente hasta situarse aproximadamente en 7, hacia el cuarto día de incubación. Sin embargo, los cementos sustituidos con Si, obtuvieron un pH ligeramente básico de 7,5 durante los dos primeros días de incubación, este valor descendió a 7 durante los días consecutivos (Figura 31), por lo que hemos obtenido cementos que se sitúan en el rango del pH fisiológico, lo que podría mejorar la citocompatibilidad de los cementos, ya que el pH ideal para los cultivos celulares se sitúa en torno a 7,2-7,4. Además estos valores se mantuvieron constantes, proporcionando un soporte adecuado para el crecimiento celular, ya que las células son muy sensibles a cambios bruscos en el pH extracelular.

El control sobre la arquitectura interna de los cementos de brushita, la porosidad, el tamaño de los poro, así como los cambios en el pH y la liberación de iones de Ca²⁺, PO₄³⁻ y SiO₄⁴⁻ es esencial para comprender la reacción de los nuevos materiales en los

Resultados y discusión: Caracterización del material

estudios de adsorción y liberación de medicamentos, estudio *in vitro* de citocompatibilidad y estudio *in vivo*.

2. ESTUDIO IN VITRO DE CITOCOMPATIBILIDAD

2.1.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CITOCOMPATIBILIDAD

La citocompatibilidad celular se estudió en la superficie de los cementos preparados al 20, 40 y 80% Si-TCP, frente a los cementos sin dopar. La respuesta *in vitro* se evaluó mediante la línea celular humana de osteoblastos MG-63.

2.1.2 PROLIFERACIÓN Y ACTIVIDAD CELULAR

Los resultados de la actividad celular del análisis estadístico ANOVA, mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al tipo de material, al tiempo de cultivo y a la interacción entre ambos factores (Tabla 10). El test de Tuckey, para evaluar el efecto del tipo del material, (Tabla 11) no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre los cementos preparados al 20 y 40% Si-TCP. Sin embargo, esta diferencia si fue significativa entre el resto de concentraciones, duplicándose la actividad celular, con el CFC preparado con el 80% Si-TCP. La Tabla 12 muestra los resultados del Test post hoc, en cuanto al día de cultivo, en el que puede verse que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los días de cultivo, excepto entre los días 5 y 7, en los que la actividad celular se mantuvo constante para cada tipo de material. A diferencia del resto de materiales, el 80% Si-CFC, fue el único que siguió aumentando su actividad celular a los 10 días de cultivo, siendo su actividad muy superior con respecto al resto de materiales (Figura 32).

Tabla 10. Análisis estadístico ANOVA de la actividad celular, de la línea celular MG-63, para CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

Fuente	Grados de libertad	Suma de los cuadrados	Media cuadrática	Valor F	P<0.05
Material	3	17725,4	5908,5	448	Si
Tiempo	3	3086,6	1028,9	78	Si
Material-Tiempo	9	11644,2	1293,8	98,1	Si

Tabla 11. Test post hoc de Tukey para evaluar el efecto del tipo del material en la actividad celular, de la línea celular MG-63, para CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

Grupo	Diferencia de medias	P<0.05
20% Si-CFC - CFC	-8,8	Si
40% Si-CFC - CFC	-8,2	Si
40% Si-CFC - 20% Si-CFC	0,6	No
80% Si-CFC - CFC	20,3	Si
80% Si-CFC - 20% Si-CFC	29,1	Si
80% Si-CFC - 40% Si-CFC	28,5	Si

Tabla 12. Test post hoc de Tukey para evaluar el efecto del tiempo en la actividad celular, de la línea celular MG-63, para CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

Grupo	Diferencia de medias	P<0.05
5 días - 3 días	7,3	Si
7 días - 3 días	9	Si
7 días - 5 días	1,7	No
10 días - 3 días	15	Si
10 días - 5 días	7,7	Si
10 días - 7 días	6	Si

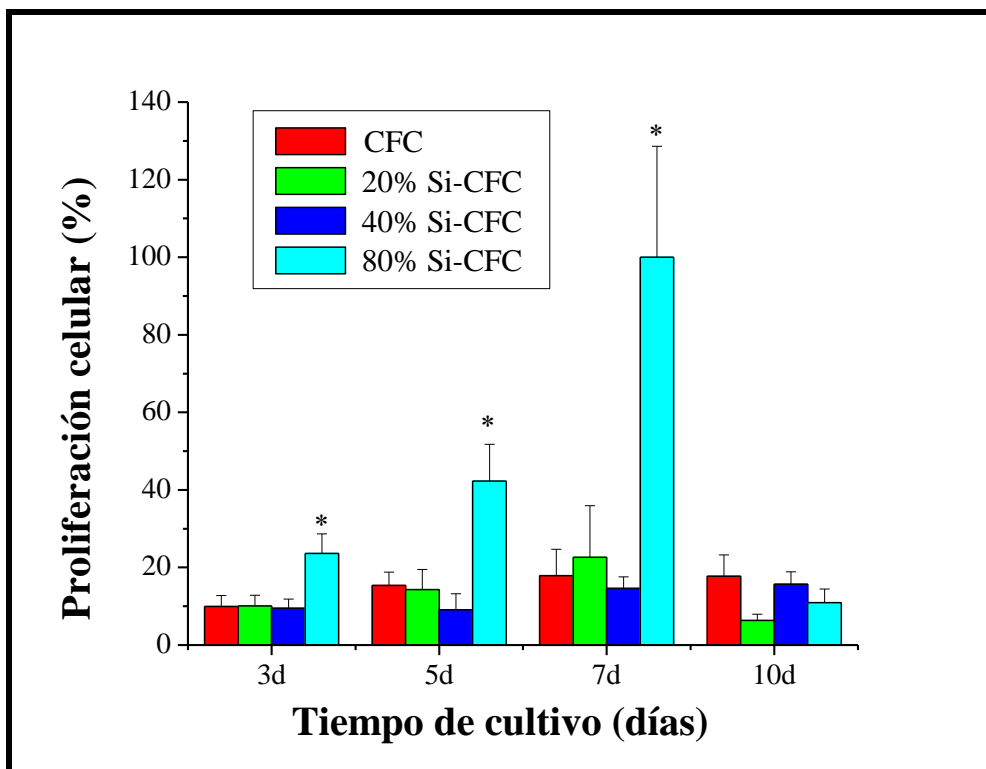
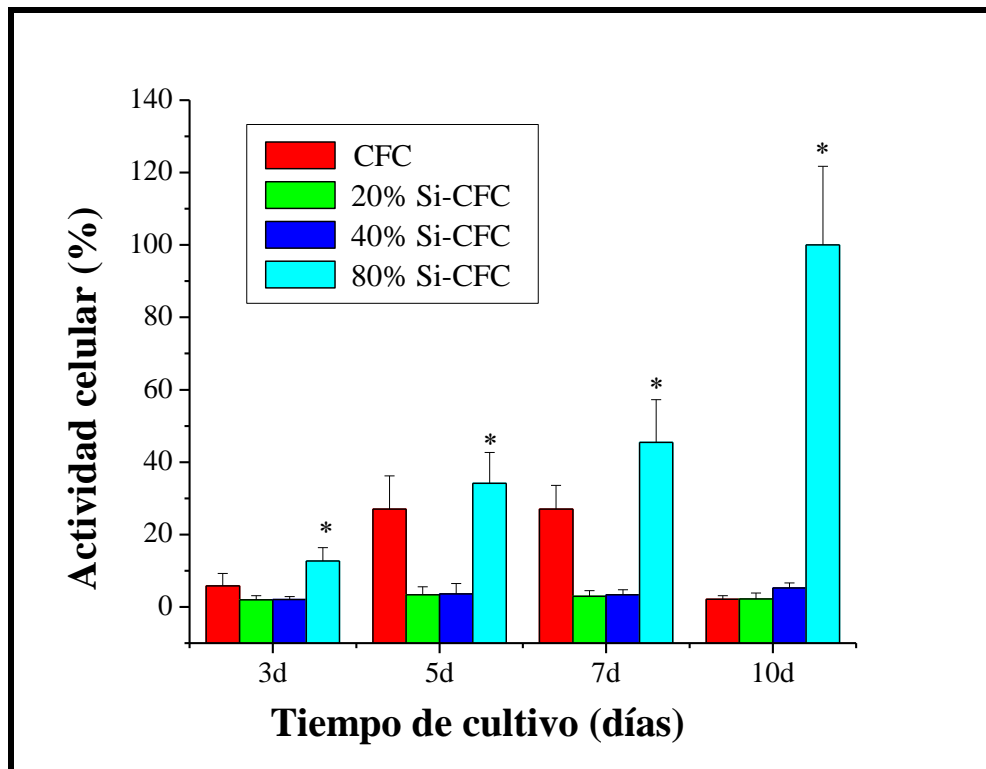


Figura 32. Actividad y proliferación de las células MG-63 después de cultivarse sobre cementos preparados con β -TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP, y 80% Si-TCP (*) estadísticamente significativo $P < 0.05$.

Los resultados de la proliferación celular del análisis estadístico ANOVA, mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al tipo de material, al tiempo de cultivo y a la interacción entre ambos factores (Tabla 13). El test post hoc de Tuckey, para evaluar el efecto del tipo del material, reveló diferencias estadísticamente significativas entre el material preparado con el 80% de Si-TCP y los cementos preparados sin silicio y dopados al 20 y 40% Si-TCP (Tabla 14). Los cementos preparados al 80% Si-TCP, triplicaron la proliferación celular, cuando se comparaban con los cementos de brushita sin sustituir (Figura 32). Sin embargo no se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los materiales preparados al 20 y 40% de Si-TCP y los cementos sin dopar. La proliferación celular se incrementó continuamente hasta el séptimo día de cultivo, existiendo diferencias estadísticamente significativas, entre todos los días de cultivo, excepto el día número 10 de cultivo que obtuvo valores similares al día número 3, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos días de cultivo (Tabla 15).

Tabla 13. *Análisis estadístico ANOVA de la proliferación celular, de la línea celular MG-63, para CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.*

Fuente	Grados de libertad	Suma de los cuadrados	Media cuadrática	Valor F	P<0.05
Material	3	1141,24422	380,41474	88,43504	Si
Tiempo	3	732,55252	244,18417	56,76551	Si
Material-Tiempo	9	1264,15663	140,46185	32,65317	Si

Tabla 14. Test post hoc de Tukey para para evaluar el efecto del tipo del material en la proliferación celular, de la línea celular MG-63, para CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

Grupo	Diferencia de medias	P<0.05
20% Si-CFC - CFC	-0,60979	No
40% Si-CFC - CFC	-0,97435	No
40% Si-CFC - 20% Si-CFC	-0,36456	No
80% Si-CFC - CFC	9,24516	Si
80% Si-CFC - 20% Si-CFC	9,85495	Si
80% Si-CFC - 40%Si-CFC	10,21951	Si

Tabla 15. Test post hoc de Tukey para para evaluar el efecto del tiempo en la proliferación celular, de la línea celular MG-63, para CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

Grupo	Diferencia de medias	P<0.05
5 días - 3 días	2,54234	Si
7 días - 3 días	8,21967	Si
7 días - 5 días	5,67733	Si
10 días - 3 días	-0,12107	No
10 días - 5 días	-2,66341	Si
10 días - 7 días	-8,34074	Si

2.1.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Al realizar la microscopía electrónica del estudio *in vitro* de las muestras se observó que las células adheridas a la superficie del cemento adquirirían una forma alargada, plana y extendida que desarrollaban filopodias o procesos digitiformes (Figuras de la 33 a la 44). Estas extensiones citoplasmáticas que desarrollaron las células, penetraban entre los cristales del material, uniéndose firmemente a la superficie de este. La longitud de estas extensiones variaba entre los distintos materiales, las de mayor longitud pueden verse en las Figuras 40 y 41, que pertenecen al cultivo sobre el 80% Si-CFC. La unión intercelular se producía a través de las filipodias, que terminaban por tapizar prácticamente la superficie del material. De la Figura 33 a la 44 se aprecia el crecimiento progresivo de las células en la superficie de los CFC sin dopar (Figuras 33 y 34), 20% Si-CFC (Figuras 35, 36 y 37), 40% Si-CFC (Figuras 38 y 39) y 80% Si-CFC (Figuras 40, 41, 42, 43 y 44), alcanzando el máximo crecimiento en el día número 7, estos datos concuerdan con el estudio *in vitro* realizado anteriormente. Un dato a destacar, es que las células cultivadas en el 80% Si-CFC presentaron su máximo crecimiento el día número 10 de cultivo, a diferencia del resto de materiales, que al décimo día decrecía respecto al séptimo (Figura 44).

Se puede observar que en el caso del cemento preparado al 80% de Si se produjo un cambio notable en la morfología de los cristales, adquiriendo una forma de flor, lo que puede indicar la formación de HA en la superficie de la muestra (Figura 40). Esto probablemente se debe a la transformación de brushita en HA o la re-precipitación de iones de calcio y fosfato en forma de HA, catalizado por los iones de silicio. Todo esto podría explicar la capacidad de los cementos preparados con el 80% Si para mantener la bioactividad.

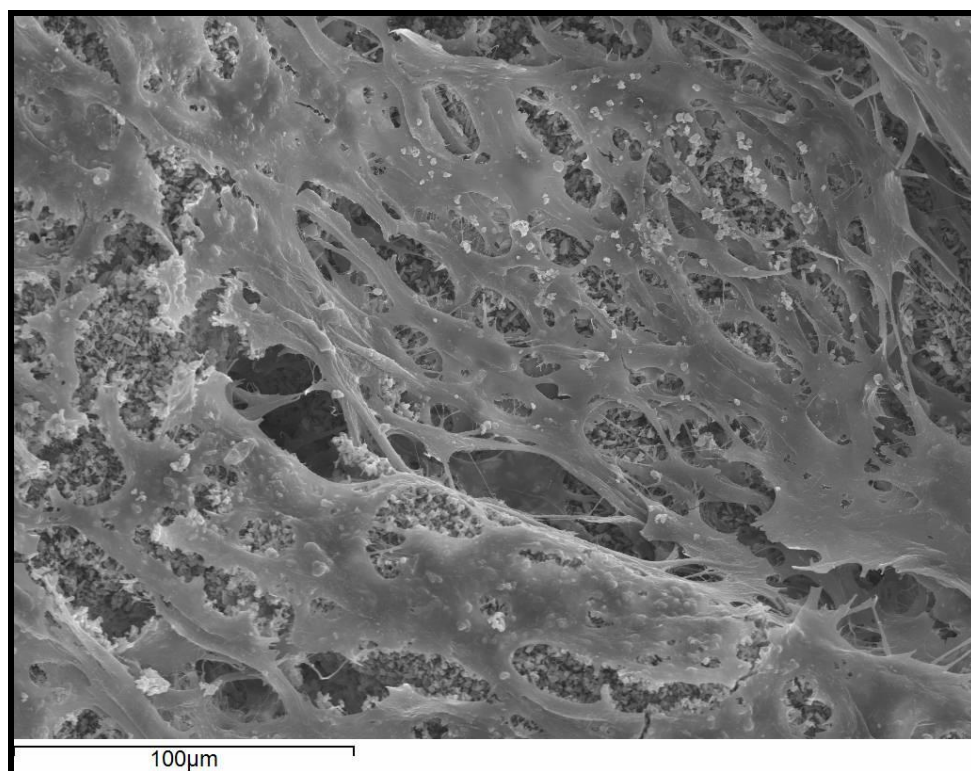


Figura 33. Imagen SEM de la superficie de CPC a los 5 días de cultivo (400X).

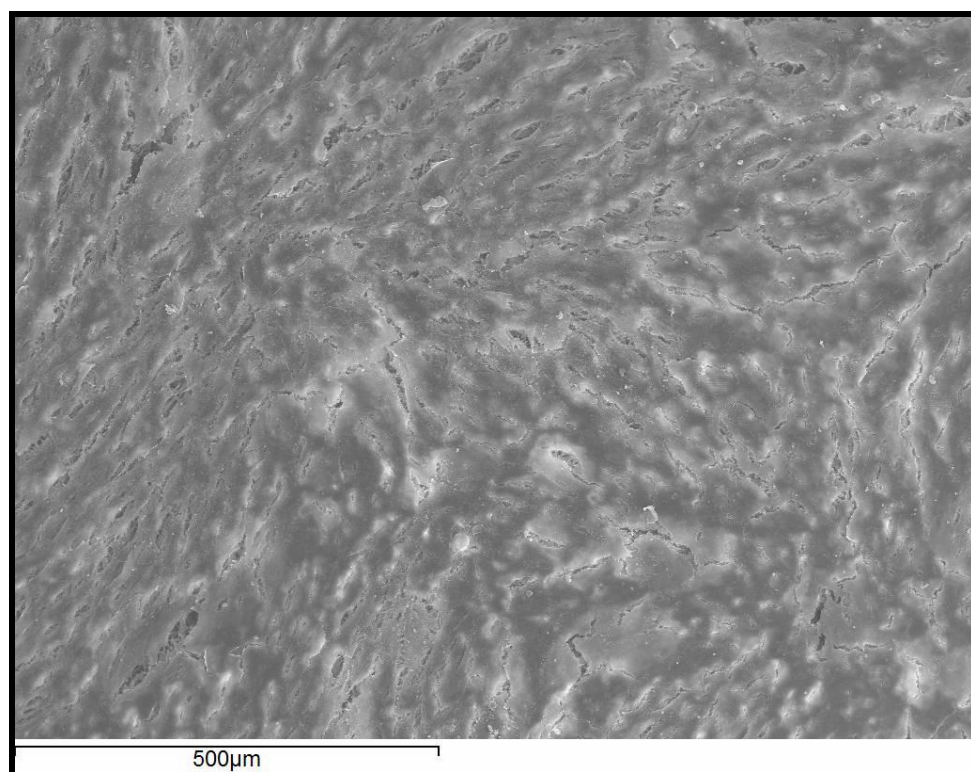


Figura 34. Imagen SEM de la superficie de CPC a los 7 días de cultivo (100X).

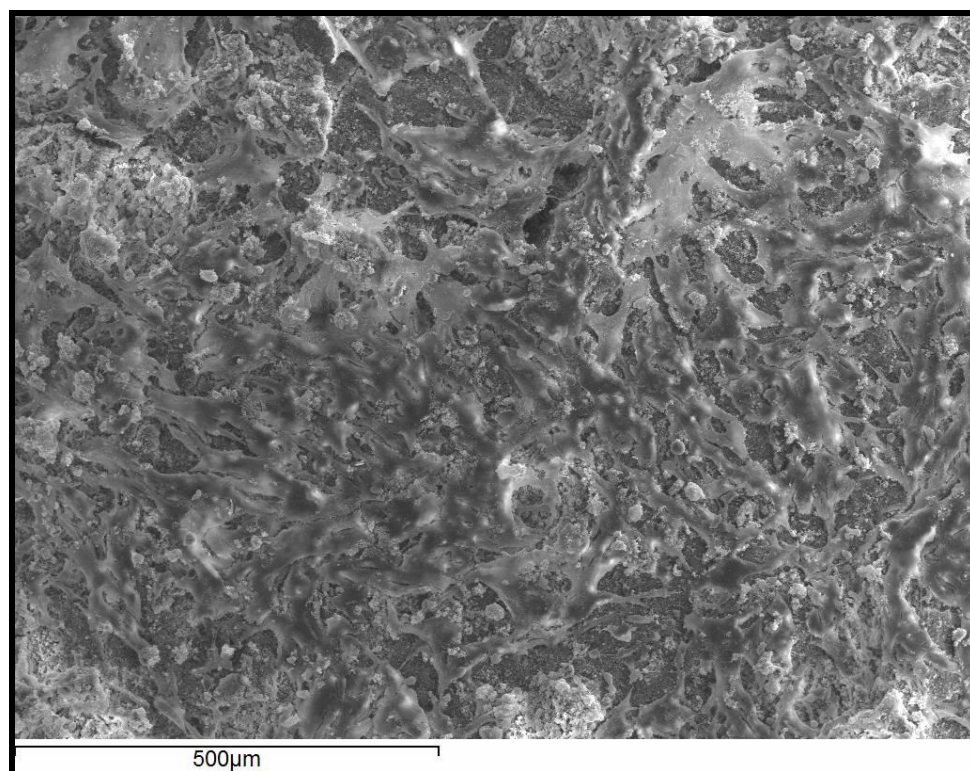


Figura 35. Imagen SEM de la superficie de 20% Si-CPC a los 7 días de cultivo (100X).

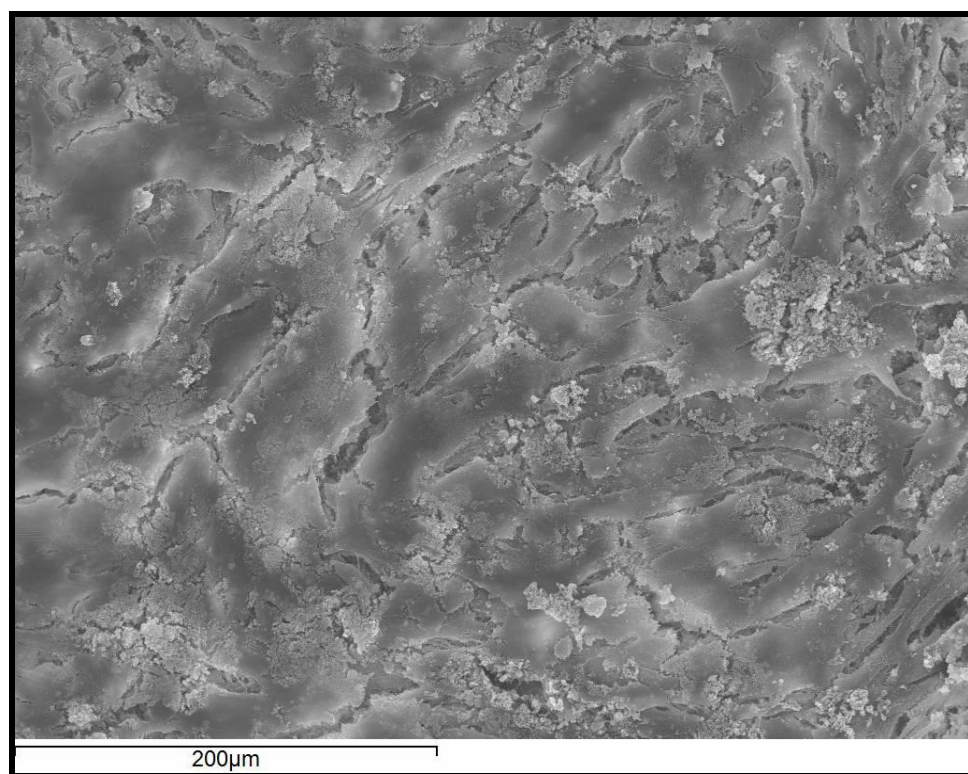


Figura 36. Imagen SEM de la superficie de 20% Si-CPC a los 7 días de cultivo (250X).

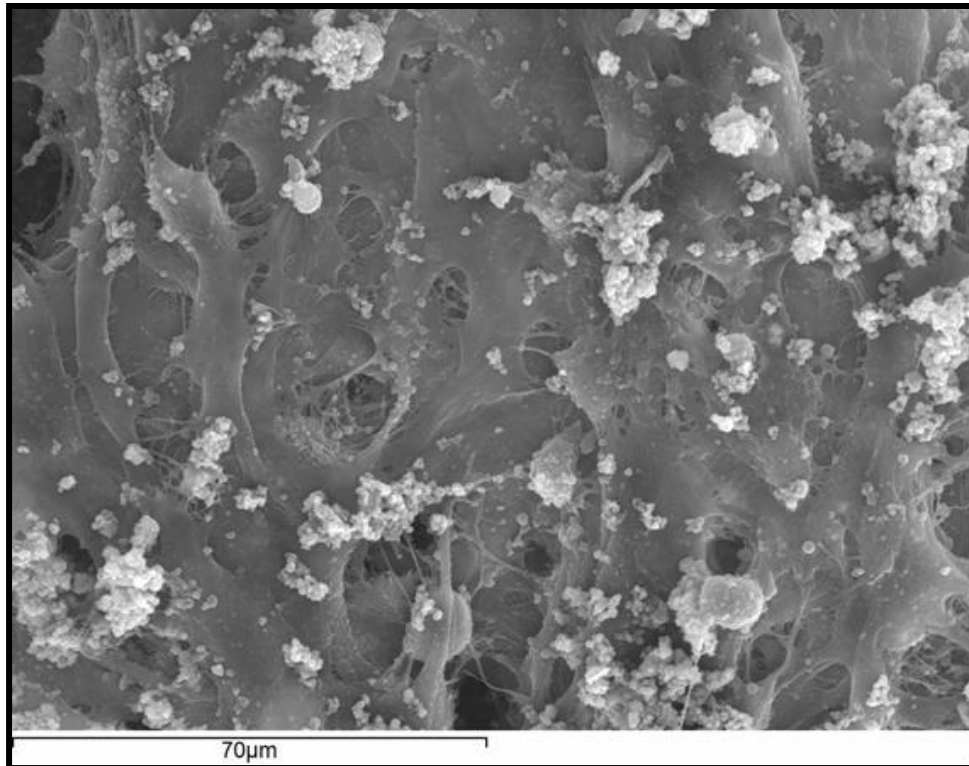


Figura 37. Imagen SEM de la superficie de 20% Si-CPC a los 10 días de cultivo (800X).

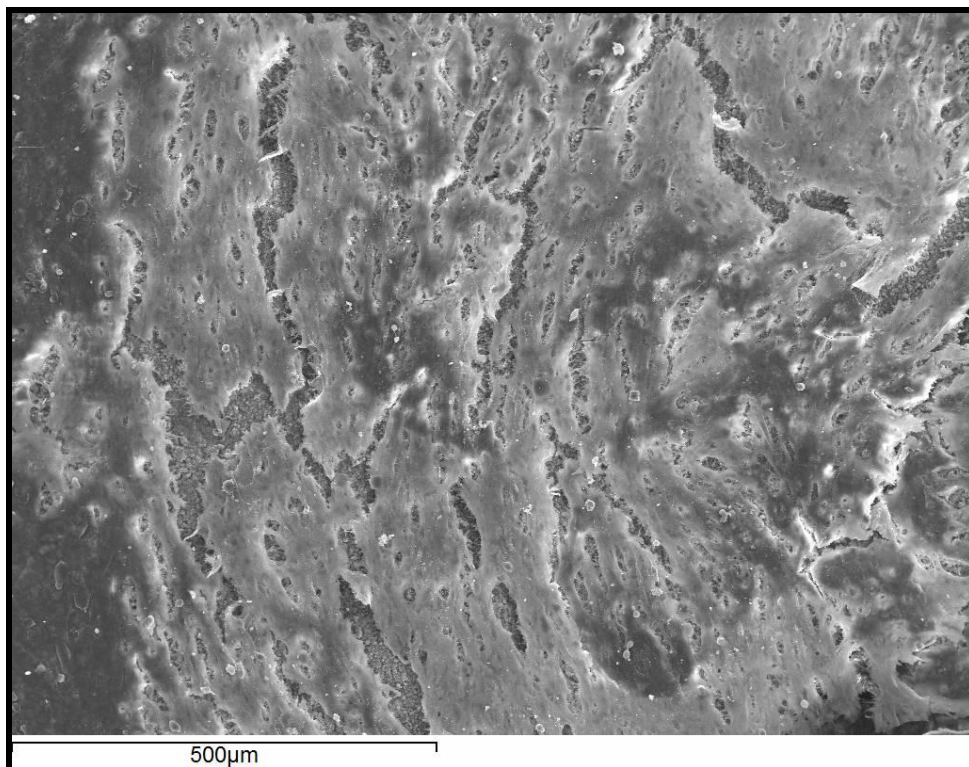


Figura 38. Imagen SEM de la superficie de 40% Si-CPC a los 7 días de cultivo (100X).

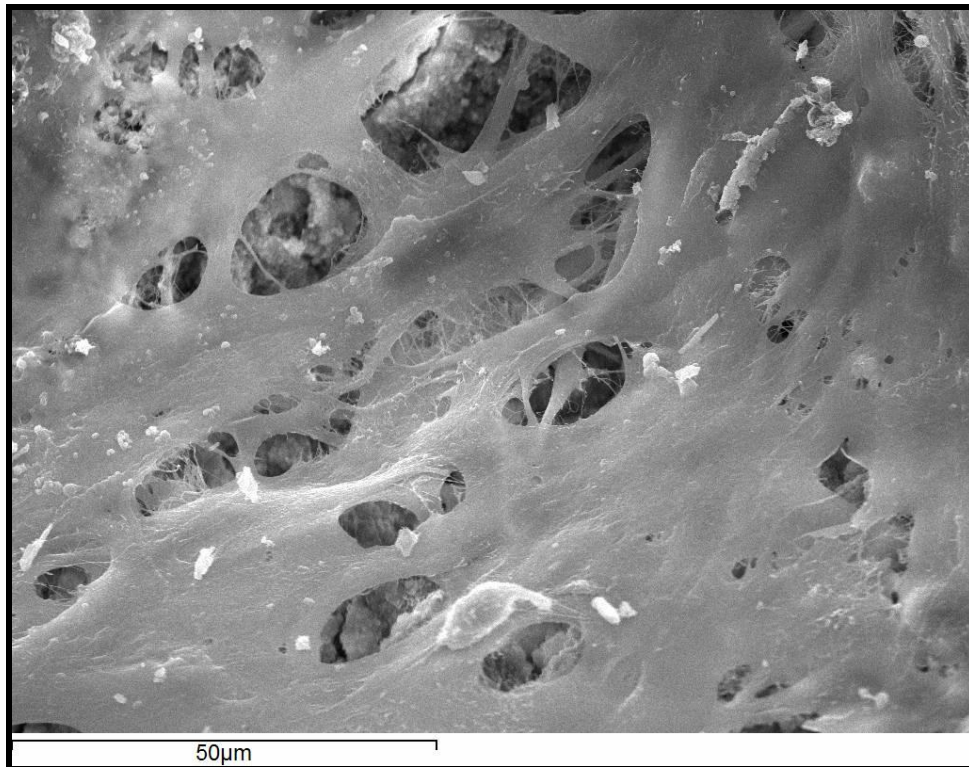


Figura 39. Imagen SEM de la superficie de 40% Si-CPC a los 7 días de cultivo (1000X).

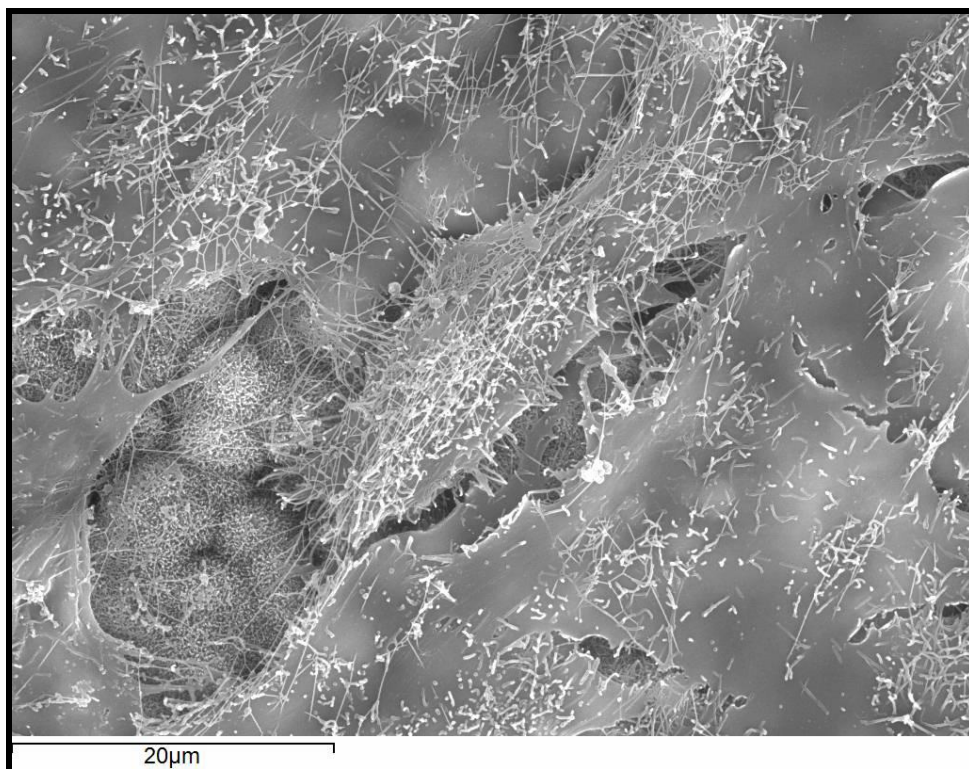


Figura 40. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC a los 5 días de cultivo (1900X).

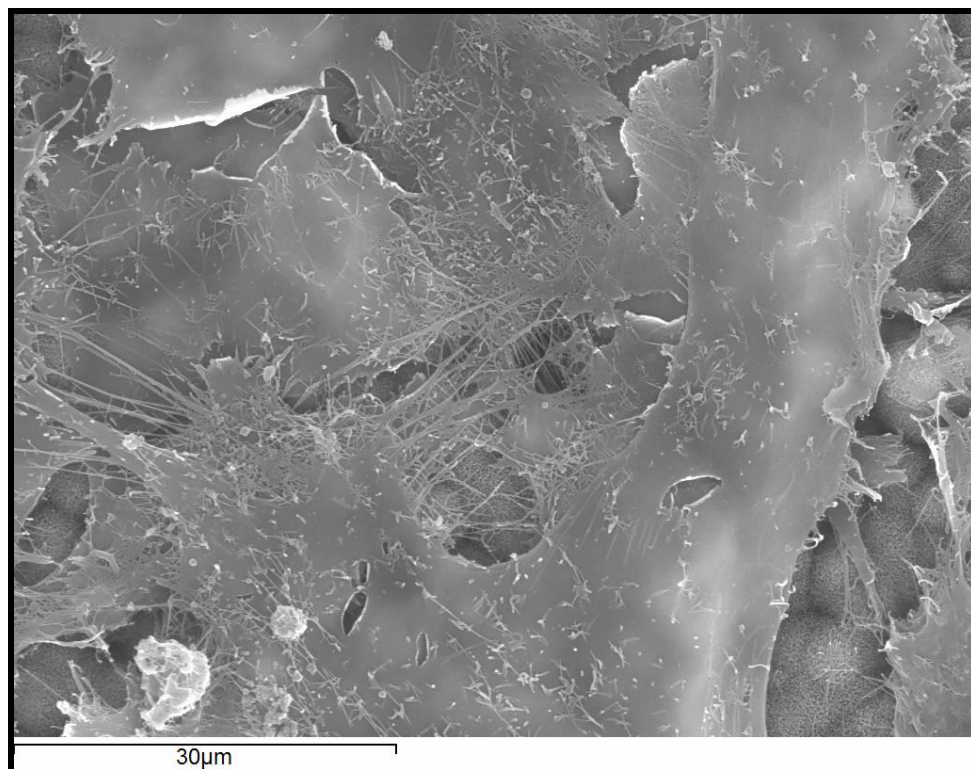


Figura 41. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC a los 5 días de cultivo (1500X).

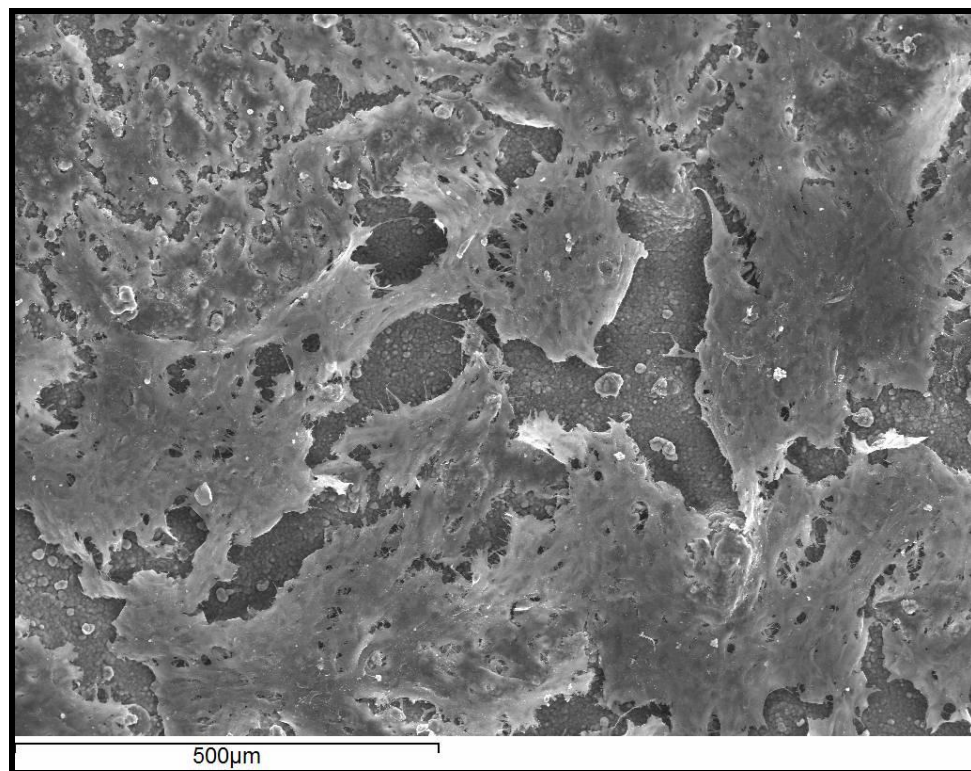


Figura 42. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC a los 7 días de cultivo (100X).

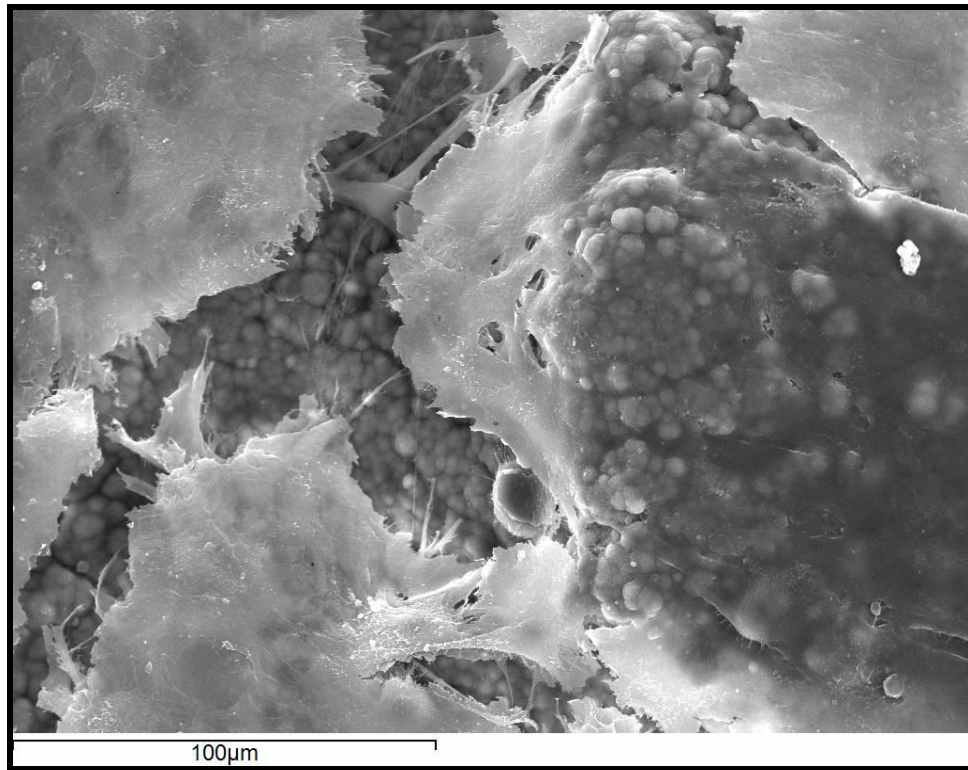


Figura 43. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC a los 7 días de cultivo (250X).

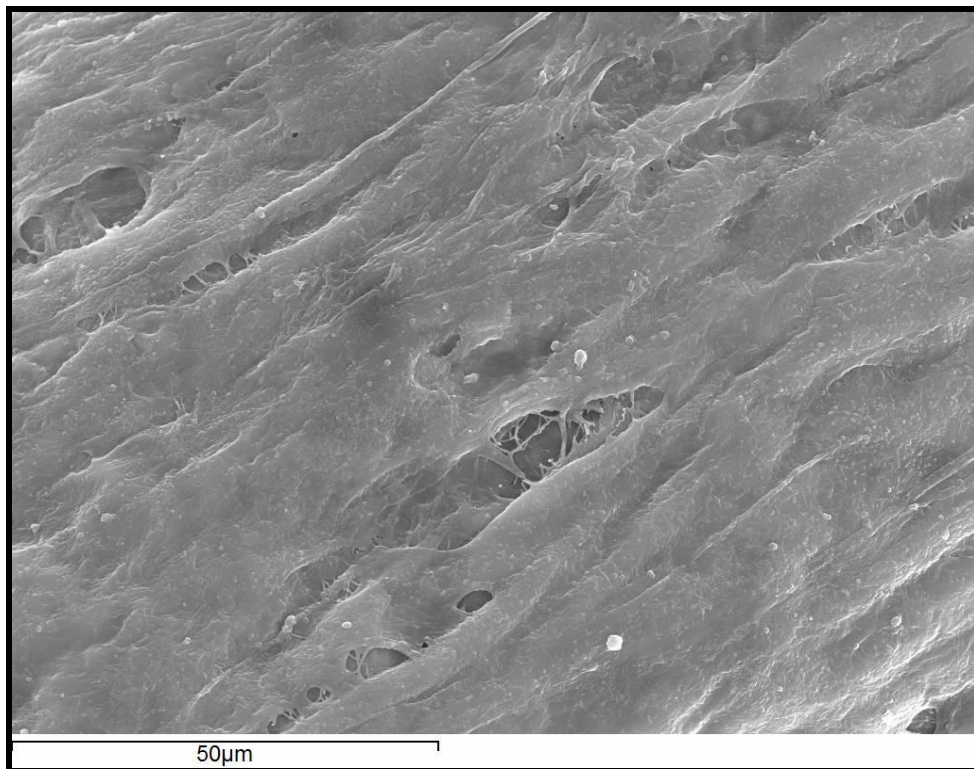


Figura 44. Imagen SEM de la superficie de 80% Si-CPC a los 10 días de cultivo (250X).

2.2 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO *IN VITRO* DE CITOCOMPATIBILIDAD

El silicio juega un papel importante durante los estadios iniciales de la formación de hueso y en los procesos de calcificación [7, 18, 119, 124]. Es uno de los elementos esenciales en el desarrollo de las células osteoblásticas, pudiendo incrementar, según el estudio de Gibson et al. [181], el número de osteoblastos y la actividad celular.

La incorporación de dióxido de silicio en nuestros materiales repercutió positivamente en la proliferación o la actividad del test de citocompatibilidad, realizado con la línea celular MG-63 utilizada en estudios previos [150, 182, 183, 184]. Las células sembradas en el cemento preparado con 20 y 40% Si-TCP, obtuvieron resultados similares. Sin embargo, en el cemento preparado con 80% Si-TCP, aumentó la proliferación celular más de 3 veces y la actividad celular más de 2 veces como muestran la Figura 32 y las Tablas del 10 al 15. Un dato a destacar es que la actividad celular de los cementos dopados al 80% de silicio, al décimo día de cultivo, fue muy superior al resto de materiales. Las imágenes obtenidas mediante el SEM refuerzan los resultados obtenidos en el test de citocompatibilidad. Los materiales con mayor concentración de silicio mostraron una mayor supervivencia celular en el tiempo, así como un mayor tapiz de células sobre su superficie como puede verse en la Figura 44. Esto concuerda con los estudios de Xu et al. [185] y Byun et al. [186] que obtuvieron un aumento en la proliferación celular estadísticamente significativa, al utilizar HA y fosfato cálcico bifásico, respectivamente, ambos dopados con silicio.

Los resultados obtenidos podrían estar provocados por la liberación de iones de Ca^{2+} y SiO_4^{4-} principalmente, y en menor medida de PO_4^{3-} , de los cementos dopados. Así como, por los cambios estructurales y morfológicos inducidos al incorporar el dióxido de silicio. Diferentes estudios, han conseguido resultados similares con iones de SiO_4^{4-} [160, 187] sobre las células osteoblásticas, utilizando ácido ortosilícico, productos de degradación de los materiales que contienen silicio (biovidrio, silicato dicálcico) o mediante la siembra directa de células sobre cerámicas sustituidas con silicio [20, 23, 132, 133, 134, 135, 136, 188]. Los iones de silicio parecen tener un efecto óptimo, sobre los osteoblastos y la regeneración ósea. La concentración de iones de Si en el medio acorta el ciclo de crecimiento de la célula osteoblástica humana, para aumentar la proliferación, diferenciación y producción de colágeno. Además tiene efectos

dependientes de la dosis en procesos de remodelado, desarrollo de osteoclastos y actividad de reabsorción ^[132, 189]. Aunque es necesario regular la concentración de silicio adecuada, para obtener un equilibrio, entre los mecanismos que controlan la actividad de las células osteoblásticas y osteoclásticas, ya que un exceso del ion podrían inducir la apoptosis celular ^[190]. Los iones de Ca^{2+} también juegan un papel esencial en el crecimiento y función celular. El calcio extracelular regula el comportamiento celular y tiene un efecto significativo en la proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas. La presencia de iones de calcio podría activar a la adenosina trifosfato (ATP), aumentando la síntesis de ADN, acelerando la mineralización del tejido duro como la dentina o el hueso. Por último, el fosfato es un componente esencial del ADN y el ARN, necesario para producir ATP. El fosfato inorgánico estimula la diferenciación, lo que resulta en la expresión de colágeno tipo X y actúa como una señal para iniciar la deposición de minerales ^[190].

Como ya hemos mencionado el sílice soluble desempeña un papel esencial en el entrecruzamiento de colágeno y proteoglicanos durante el crecimiento óseo ^[124]. La matriz extracelular está compuesta por moléculas proteicas complejas del hueso que median en la adhesión de los biomateriales. El colágeno es la proteína que encontramos en mayor cantidad, seguido de la osteonectina, osteopontina y osteocalcina, entre otras. Estas proteínas son secretadas en los osteoblastos y usadas como marcadores. En el estudio de Byun et al. ^[186] la osteonectina, osteopontina y el colágeno tipo I se expresaron de forma más elevada en aquellos fosfatos cálcicos dopados con silicio.

El aumento en la proliferación y la actividad de las células osteoblásticas, podría estar mediado por el aumento en la producción de los factores de crecimiento y la actividad de los genes, que son necesarios para la proliferación osteoblástica, la remodelación de la matriz extracelular y la adhesión matriz-célula. Son numerosos los estudios que han analizado el aumento en el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) ^[134], la proteína ósea morfogénica 2 (BMP-2), la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y la codificación de genes para la osteocalcina, ALP, BMP-2 y Smad1 en materiales que contenían silicio ^[133]. En estos estudios, parece que la incorporación de silicio mejoró la proliferación, diferenciación y expresión de genes.

No solo hubo un aumento en el número de células al incorporarse mayor concentración de silicio, sino que también hubo cambios en la fisiología celular. Ya que las células desarrollaban extensiones citoplasmáticas mayores según aumentaba la concentración de silicio, como puede apreciarse en las Figuras 40 y 41. Las extensiones citoplasmáticas son regiones de la membrana plasmática celular que contienen redes o haces de microfilamentos de actina con los cuales permiten, por un lado, el movimiento de migración de las células a lo largo del sustrato, y por otro, adherirse mejor a los cristales del cemento ^[191]. En el estudio de Byun et al. ^[186] las células cultivadas sobre la superficie de los fosfatos cálcicos bifásicos dopados con silicio tenían un mayor número de filipodias, que crecían junto a la membrana citoplasmática, en comparación con los cementos sin dopar, lo que indicaba una buena adhesión celular. La unión entre material y célula es una propiedad esencial para el desarrollo, mantenimiento y remodelado del tejido óseo. La interacción entre ambos juega un papel crítico en la supervivencia, proliferación, diferenciación y mineralización de la matriz. Y en consecuencia en la formación de hueso, función osteoclástica y reabsorción ósea ^[192].

Por lo que podemos concluir que los cementos con β -TCP modificado con silicio proporcionan un soporte adecuado para la proliferación y actividad de los osteoblastos, lo que supone que estos materiales podrían ser empleados como sustitutos óseos.

3. EFICACIA DEL CEMENTO COMO MATRIZ PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

La posibilidad de utilizar estos materiales como vehículos para el suministro controlado de fármacos, además de sustitutos óseos, representa una alternativa atractiva para el tratamiento de enfermedades que requieren terapias largas y que están asociadas a pérdidas importantes de hueso.

3.1 RESULTADOS DE LA EFICACIA DEL CEMENTO COMO MATRIZ PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

En los CFC el fármaco se puede incluir mediante adsorción en la superficie del cemento o mediante su incorporación en una de sus dos fases durante su síntesis, lo que permite que se distribuya por todo el volumen del material y no solo en la superficie de este, por ello se realizaron dos métodos para introducir la vancomicina: i) adsorción desde la solución e ii) incorporación del antibiótico en la fase sólida del cemento.

3.1.1 CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Se evaluó la capacidad de los cementos de fosfato cálcico sustituidos con Si como vehículo para liberar medicamentos, utilizando la vancomicina como droga modelo. Las pastillas a diferentes porcentajes de silicio, se incubaron en una solución con distintas concentraciones de vancomicina, 5, 10 y 20 mg/ml, a lo largo de 24 horas, durante las cuales las pastillas de los cementos adsorbieron la droga.

Los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP adsorbieron prácticamente la misma cantidad de antibiótico, al incubarse en 5 mg/ml de vancomicina. Sin embargo cuando se incubaban en una concentración de 10 mg/ml, los cementos preparados con 80% Si-TCP, adsorbieron una cantidad significativamente mayor de vancomicina, comparado con los cementos preparados con β -TCP o 40% Si-TCP. Este valor se incrementó considerablemente al incubarse en 20 mg/ml de vancomicina. Por lo que los cementos dopados con silicio, mostraron una mayor afinidad por la vancomicina, teniendo una mayor adsorción del fármaco a medida que aumentaba la concentración de silicio, como puede verse en la Figura 45.

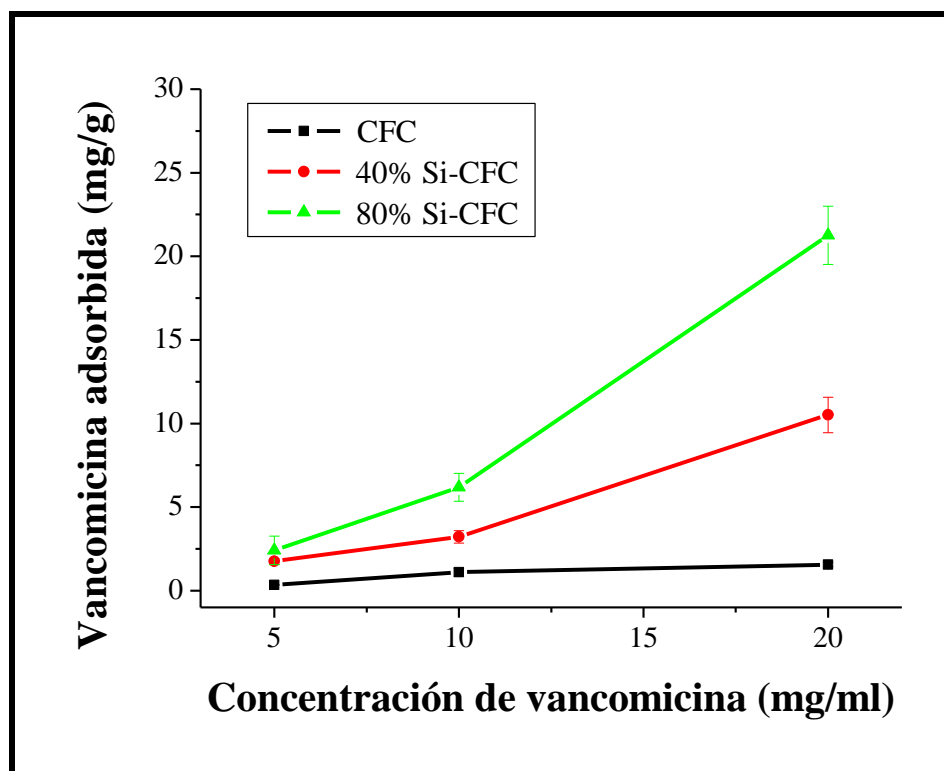


Figura 45. Adsorción de vancomicina de los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP. Las muestras se incubaron en soluciones de 5, 10 y 20 mg/ml de vancomicina.

Los perfiles de liberación de la vancomicina (Figura 46 A, 46 B y 47) fueron analizados utilizando el modelo de Korsmeyer-Peppas o también llamada Ley de potencia. Para identificar los mecanismos de liberación del antibiótico, este modelo solo se puede ajustar el perfil de la liberación hasta el 60% del fármaco liberado tras la incubación ^[13] su fórmula es:

$$M(\%) = kt^n \quad (5)$$

Donde:

$M(\%)$: porcentaje acumulativo de droga liberada en función del tiempo (t).

n : exponente que indica el mecanismo de liberación del sistema.

$K(h^{-1})$: constante que incorpora las características estructurales y geométricas de la matriz, y nos proporciona la velocidad de liberación.

Para una geometría cilíndrica, como es el caso de las pastillas de cemento, un valor de $n \leq 0.45$, indica que la liberación de vancomicina es por difusión de Fickian. Si $n \geq 0.89$, la liberación de medicamento es por hinchamiento, lo que llamamos un transporte de caso II. Y si el valor de n se encuentra entre 0.45 y 0.89, hablaremos entonces de un transporte anómalo, donde ambos fenómenos se superponen [192, 193].

i) Muestras preparadas mediante absorción desde disolución:

Los perfiles de liberación del antibiótico que muestran las Figuras 46 A, 46 B y 47 se vieron significativamente afectados, por la presencia de iones de SiO_4^{4-} . Los cementos de brushita no dopados, incubados a 5 mg/mg, liberaron casi el 60% de la dosis previamente adsorbida, en aproximadamente 13 horas y el 80% a las 157 horas, con una velocidad de liberación de aproximadamente de 22 h^{-1} . Mientras que en cemento preparado con 40% Si-TCP, disminuyó la velocidad de liberación hasta aproximadamente 17 h^{-1} , liberando tan solo el 41% de la dosis total adsorbida después de 157 h. El perfil de liberación fue lineal para el cemento preparado con 80% Si-TCP, liberándose el 27% del total adsorbido en 157 h, con una velocidad constante de 6 h^{-1} (Figura 46 A). Por lo que la cinética de liberación, cambió con los cementos dopados al 80% de silicio, de una cinética de primer orden, en la cual la velocidad de disolución está en función de la concentración del fármaco disuelto; a una de orden cero, en el que la velocidad de liberación es constante e independiente de la concentración del fármaco disuelto. El mecanismo de liberación según el modelo de Korsmeyer-Peppas para los tres tipos de cementos, fue controlada por difusión, al ser el valor del exponente n menor de 0.45. El perfil de liberación de la vancomicina aplicando el modelo de Korsmeyer-Peppas se muestra en la Tabla 16.

Los cementos incubados en una solución antibiótica de 10 mg/ml, experimentaron un incremento en la velocidad de la liberación de vancomicina. Los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP liberaron el 93%, 62% y 53%, respectivamente, después de 157 h. Para los cementos preparados con β -TCP y 40% Si-TCP el mecanismo de liberación, según el modelo de Korsmeyer-Peppas, fue por difusión. Mientras que, para los cementos con el 80% Si-TCP, fue mediante transporte anómalo, con una cinética de liberación de orden cero, a una velocidad prácticamente lineal de 5 h^{-1} (Figura 46 B y Tabla 16). El resto de concentraciones (β -TCP, 40% Si-TCP) siguieron una cinética de primer orden.

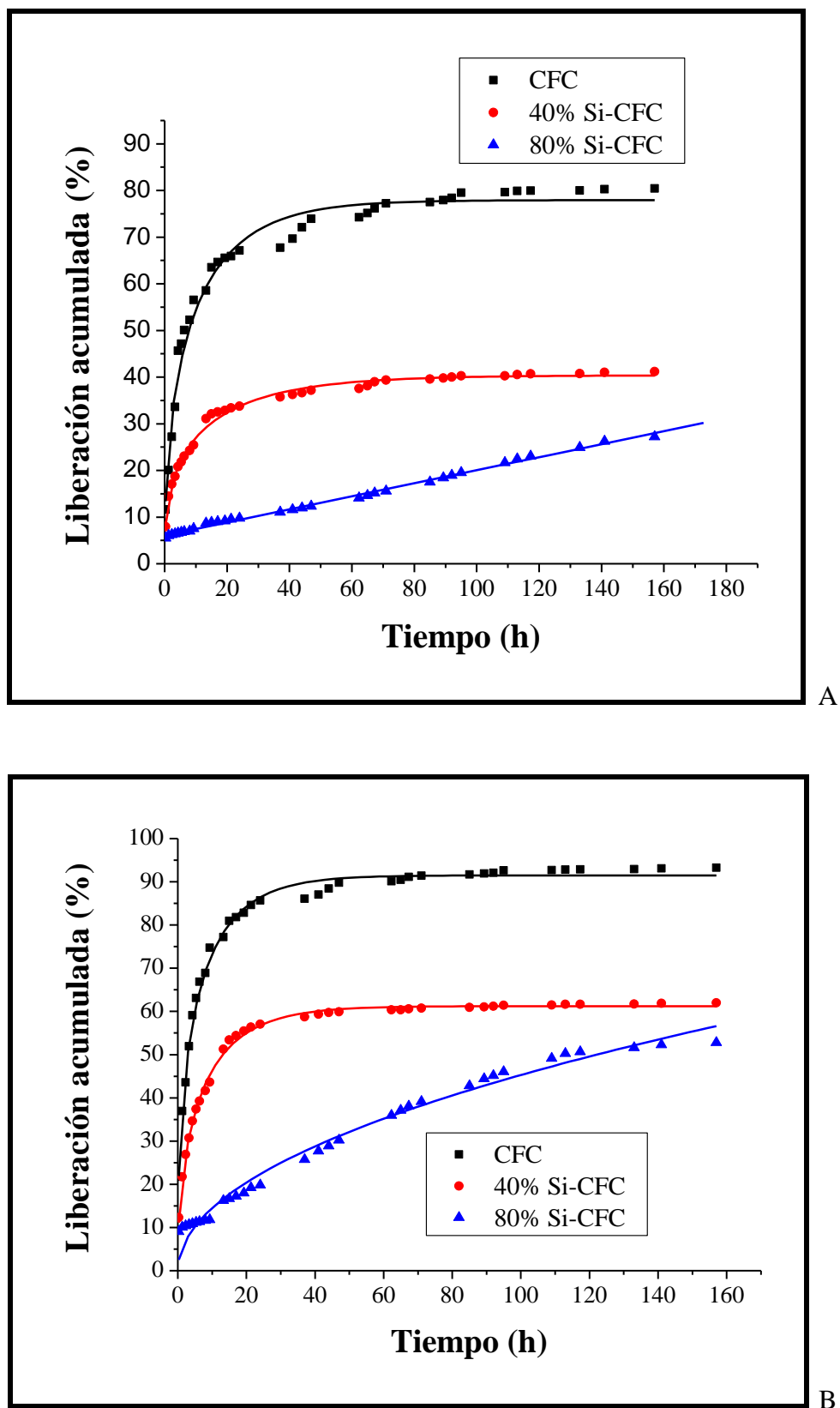


Figura 46. Liberación de vancomicina de los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP. Las muestras se incubaron en 5 (A) y 10 (B) mg.ml⁻¹ de vancomicina.

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

La velocidad de liberación, de los cementos incubados en 20 mg/ml de vancomicina, fue superior a la de las dos concentraciones anteriores, llegando a 36 h⁻¹ en el 80% de Si-TCP. La cantidad de fármaco liberado también se vio incrementada, llegándose a liberar el 60% de la droga en la primera media hora para los cementos sin sustituir con (SiO₄)⁴⁻. La cantidad total de droga liberada a las 142 horas fue del 98%, 61% y 62% para los cementos preparados con β -TCP, 40%Si-TCP y 80%Si-TCP respectivamente, como muestra la Figura 47. La cinética de liberación fue de primer orden y el mecanismo de liberación por difusión para todos los cementos (Tabla 16). En el caso del β -TCP no se pudo calcular, ya que en la primera media hora se había liberado más del 60% de la droga.

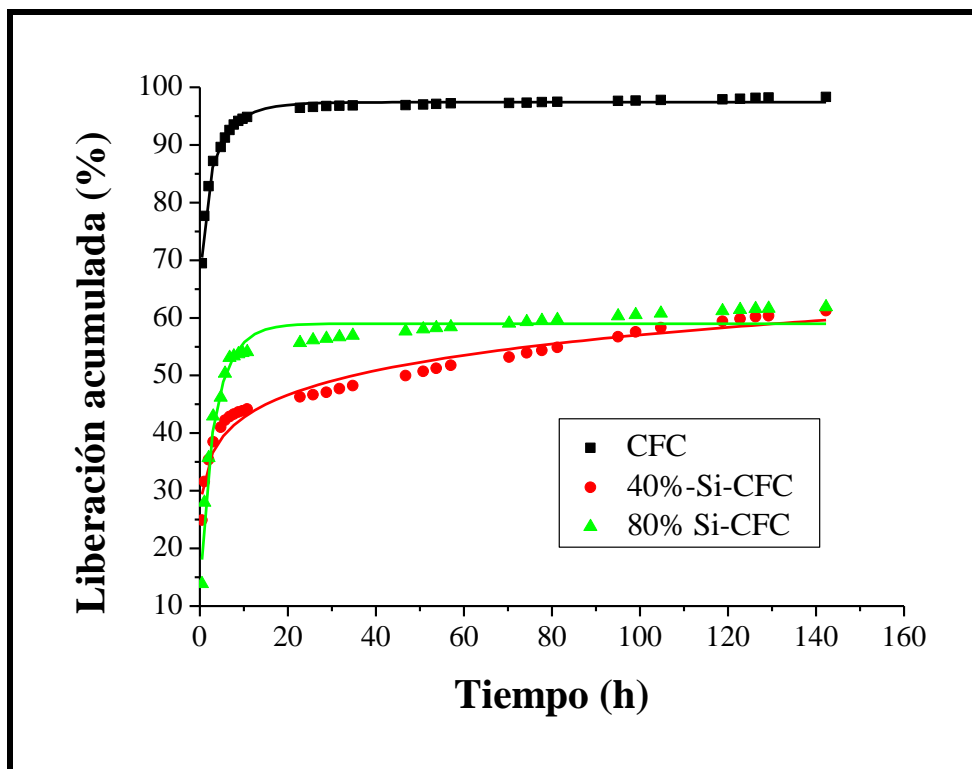


Figura 47. Liberación de vancomicina de los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP. Las muestras se incubaron en 20 mg.mL⁻¹ de vancomicina.

Tabla 16. Valores obtenidos mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas para los CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC incubados al 5, 10 y 20 mg/ml de vancomicina.

Material	5 mg/ml			10 mg/ml			20 mg/ml		
	$K (h^{-1})$	n	R^2	$K (h^{-1})$	n	R^2	$K (h^{-1})$	n	R^2
CFC	22 ± 2	$0,42 \pm 0,05$	0,94705	33 ± 1	$0,38 \pm 0,02$	0,99223	-	-	-
40%Si-CFC	17 ± 1	$0,19 \pm 0,01$	0,93624	27 ± 2	$0,21 \pm 0,02$	0,90277	$32,3 \pm 0,5$	$0,12 \pm 0,01$	0,96149
80%Si-CFC	$6,1 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,01$	0,99794	$5,0 \pm 0,4$	$0,50 \pm 0,02$	0,98047	$35,6 \pm 0,13$	$0,13 \pm 0,02$	0,7472

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

También se calculó el número de capas de vancomicina que se formaban sobre la pastilla de cemento una vez que se incubaba. Para realizar este cálculo, partimos de hallar el área de la pastilla mediante su peso y su área de superficie específica (SSA), por una parte; y por otra, el área que ocupan las moléculas de vancomicina que hay en cada pastilla de cemento una vez adsorbido el antibiótico. Para ello utilizamos la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ capas vancomicina} = [(CA_V) / PM_V] * n^{\circ} \text{ de Avogadro} * AM_V / SSA \quad (6)$$

Donde:

CA_V : cantidad adsorbida de vancomicina.

PM_V : peso molecular de la vancomicina

AM_V : el área de una molécula de vancomicina

Los valores obtenidos se clasificaron en la tabla expuesta a continuación:

Tabla 17: Número de capas de vancomicina para los cementos preparados con β -TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP al incubarse en 5, 10 y 20 mg/ml de vancomicina.

Material	Área molécula vancomicina (nm) ²	Peso (g)	SSA (m ² /g)	Nº capas con 5mg/ml	Nº capas con 10 mg/ml	Nº capas con 20 mg/ml
CFC	5,5	0,584	3,39	0,39321	1,2404	1,76334
40% Si-CFC	5,5	0,596	5,8	0,2255	0,7104	1,00984
80% Si-CFC	5,5	0,653	28,7	1,54117	4,86169	6,91131

El número de capas de vancomicina aumentaba, al aumentar la concentración de antibiótico dentro de un mismo material. Los cementos con 80% de Si-TCP fueron los que tuvieron un mayor número de capas, aproximadamente 7, cuando se incubaba a 20 mg/ml de vancomicina. Esto podría relacionarse con el área de superficie del cemento,

puesto que ascendía notablemente en los cementos dopados al 80%, siendo de 28,7 m²/g, frente a los 3,39 m²/g de los cementos sin dopar (Tabla 17).

ii) Muestras preparadas mediante incorporación de la vancomicina al cemento:

Por otro lado se analizó la liberación de medicamentos de los cementos de fosfato cálcico sustituidos con silicio, cuando se incorporaba el antibiótico en la fase sólida del cemento. En este caso también se utilizó la vancomicina como droga modelo. Se emplearon 8,4 mg, como dosis baja, y 100 mg, como dosis alta de vancomicina, por cada 2 g de polvo (1,14 g de β -TCP y 0,86 g de MCPM).

Se calculó tanto el tiempo de fraguado como las propiedades mecánicas de las pastillas de cemento, para valorar si la incorporación de la vancomicina influía sobre estas, los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Tiempo de fraguado y fuerza de tensión diametral de las pastillas sin vancomicina y con 100 mg de vancomicina en su fase sólida, para los cementos: CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

	Sin vancomicina		100 mg vancomicina		
Material	Tiempo de fraguado	DTS (MPa)	Tiempo de fraguado	DTS (MPa)	P/L (g.ml ⁻¹)
CFC	25'	1,9 \pm 0,2	32' 36"	1,5 \pm 0,7	2,5
20% Si-CFC	1' 40"	1,3 \pm 0,2	5' 6"	0,12	2,5
40% Si-CFC	2' 30"	2,5 \pm 0,4	2' 13"	1,7 \pm 0,3	2
80% Si-CFC	3' 30"	0,7 \pm 0,1	8' 17"	0,7 \pm 0,1	1,5

Al igual que pasaba con el cemento sin vancomicina, a medida que aumentábamos el porcentaje de silicio, debía disminuir el porcentaje de p/l. El tiempo de fraguado se incrementó con los cementos con vancomicina en su fase sólida, el único material que permaneció con valores similares fue en el de 40% Si-CFC. Las

propiedades mecánicas empeoraron ligeramente, especialmente con los materiales que contenían 20 y 40% de Si-TCP.

Los perfiles de liberación del antibiótico que se muestran en la Figura 48 se ven claramente afectados por la presencia de silicio, al igual que en el sistema por adsorción. Para los cementos con baja dosis de vancomicina, 8,4 mg, la liberación de vancomicina de los cementos preparados con β -TCP, 20% Si-TCP y 40% Si-TCP, se caracterizaron por una liberación inicial brusca entre el 90 y 60% de la dosis adsorbida, a las 24 horas de la incubación. Sin embargo el cemento preparado con el 80% de silicio, mostró una liberación constante de orden cero de 0,29% h^{-1} durante 10 días (Tabla 19). El mecanismo de difusión según el modelo de Korsmeyer-Peppas fue por difusión para las distintas concentraciones de Si.

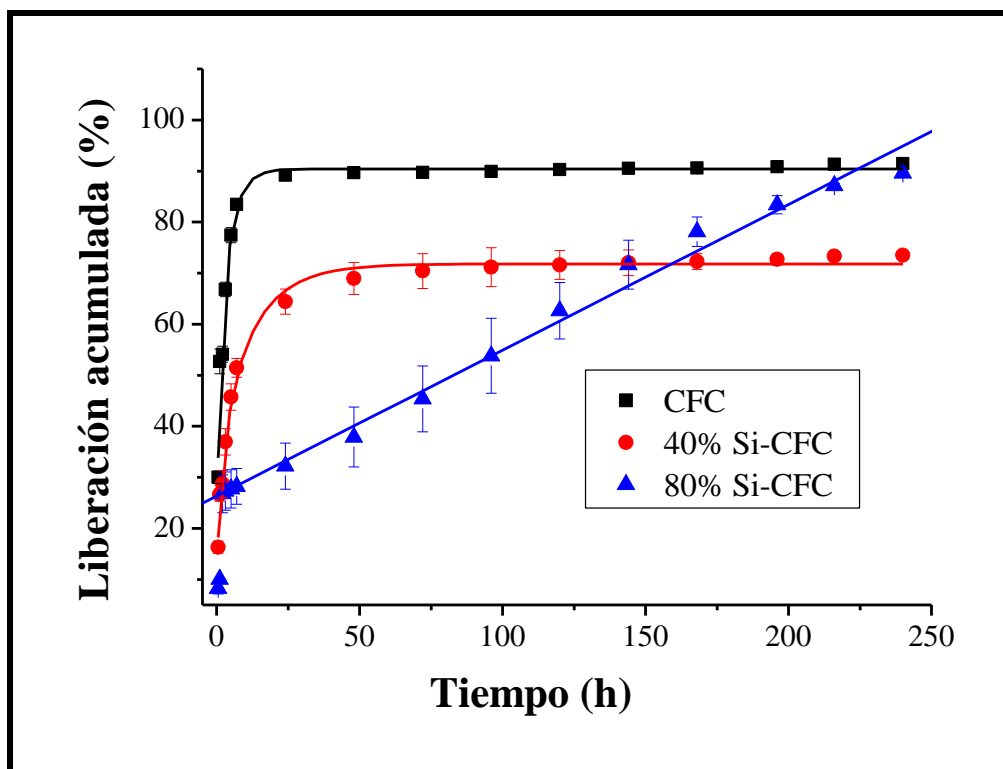


Figura 48. Liberación de vancomicina de los cementos: CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC preparados con 8,4 mg de vancomicina en su fase sólida.

Tabla 19. Valores obtenidos mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas para los cementos con 8,4 mg de vancomicina en su fase sólida.

Material	$K (h^{-1})$	n	R^2
CFC	45 ± 6	$0,4 \pm 0,2$	0,73262
40% Si-CFC	24 ± 1	$0,41 \pm 0,05$	0,97875
80% Si-CFC	16 ± 2	$0,24 \pm 0,04$	0,87484

Al incorporarse 100 mg de vancomicina, los cementos liberaron el 60% de la droga, a las 5, 7, 73 y 168 horas de su incubación, con los cementos preparados con β -TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP, respectivamente. La velocidad de liberación del antibiótico era mucho más lenta según aumentaba el porcentaje de silicio en los cementos. Los cementos que contenían un 80% de silicio tuvieron una velocidad lineal de $2 h^{-1}$, respecto a los que estaban sin dopar, que era de $37 h^{-1}$. Por lo que la constante cinética de los cementos preparados al 80% de Si-TCP pasó a ser de orden cero, a diferencia del resto de concentraciones. El mecanismo de liberación de la vancomicina mediante modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas fue por difusión en los cementos dopados al 40% de silicio, donde n era menor de 0,45. El resto de materiales (CFC, 20% Si-CFC y 80% Si-CFC) siguieron un mecanismo de transporte anómalo en la liberación del antibiótico, al encontrarse los valores de n entre 0,45 y 0,89 (Figura 49 y Tabla 20).

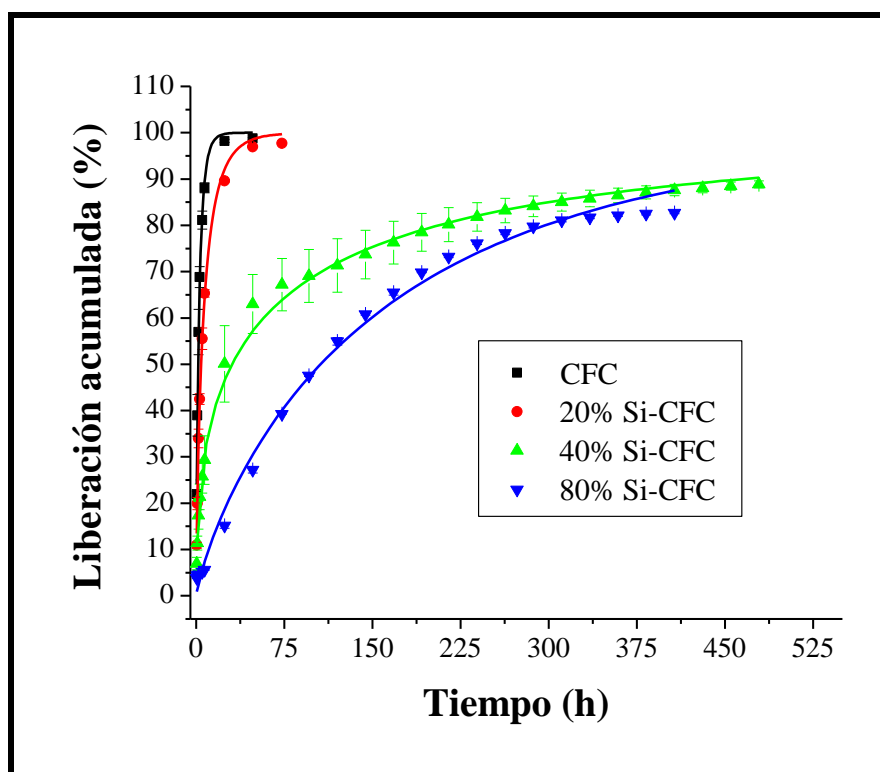


Figura 49. Liberación de vancomicina de los cementos: CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC preparados con 100 mg de vancomicina en su fase sólida.

Tabla 20. Valores obtenidos mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas. Para los cementos con 100 mg de vancomicina en su fase sólida.

Material	$K (h^{-1})$	n	R^2
CFC	37 ± 2	$0,60 \pm 0,06$	0,97554
20% Si-CFC	21 ± 1	$0,63 \pm 0,05$	0,98521
40% Si-CFC	$12,3 \pm 0,5$	$0,45 \pm 0,02$	0,99224
80% Si-CFC	$1,6 \pm 0,3$	$0,74 \pm 0,04$	0,99192

Los cambios producidos en la cinética de liberación, parecen estar relacionados con las características estructurales de los cementos dopados con silicio. En concreto con el aumento del área específica de superficie y la disminución del promedio del diámetro de poro (Tabla 21), que parecen afectar a los valores del exponente n y de la

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

constante K de la ecuación (5), como queda representado en las Figuras 50 y 51. Por lo que al aumentar el área de superficie y descender el diámetro medio de poro, se producía un descenso de la constante K y del exponente n .

Estos cambios en la estructura del cemento podrían explicar, el desplazamiento de una cinética de primer orden, característica de los cementos sin dopar o con bajo porcentaje de Si, a una de orden cero, presente en todos cementos dopados al 80% de Si de este trabajo.

Tabla 21. Porosidad, diámetro de poro y área específica para los cementos: CFC, 20% Si-CFC, 40% de Si-CFC y 80% de Si-CFC.

Material	Porosidad-Hg (%)	Diámetro de poro medio (μm)	Área específica (m^2/g)
CFC	37	0,135	$3,39 \pm 0,01$
20% Si-CFC	41	1,725	$4,93 \pm 0,02$
40% Si-CFC	43	0,048	$5,8 \pm 0,1$
80% Si-CFC	41	0,037	$28,7 \pm 0,1$

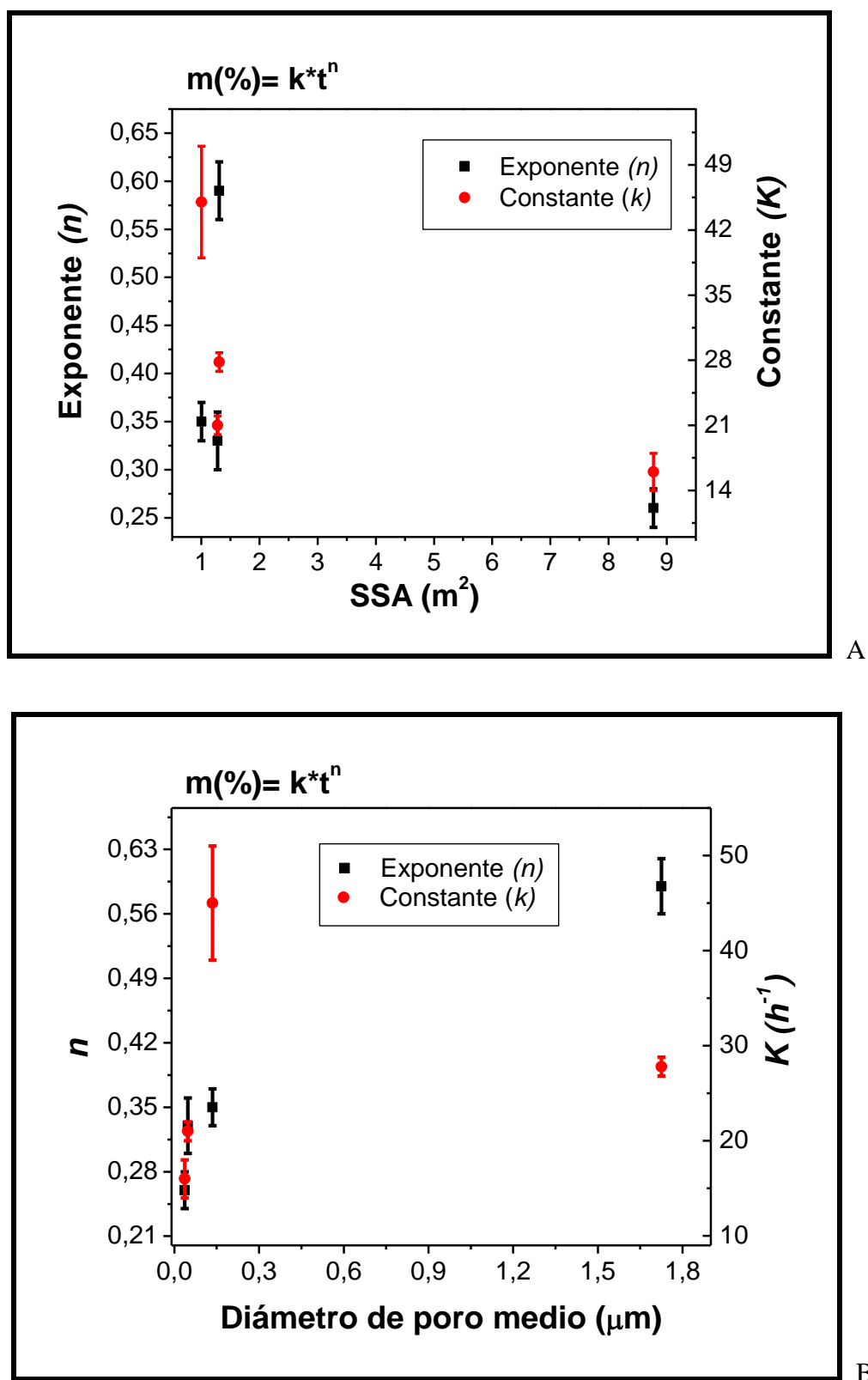


Figura 50. Relación del área específica (A) y el diámetro medio de poro (B) para los valores del exponente n y de la constante K de la ecuación de Korsmeyer-Peppas, en aquellos cementos a los que se les incorporó 8,4 mg/ml de vancomicina en su fase sólida.

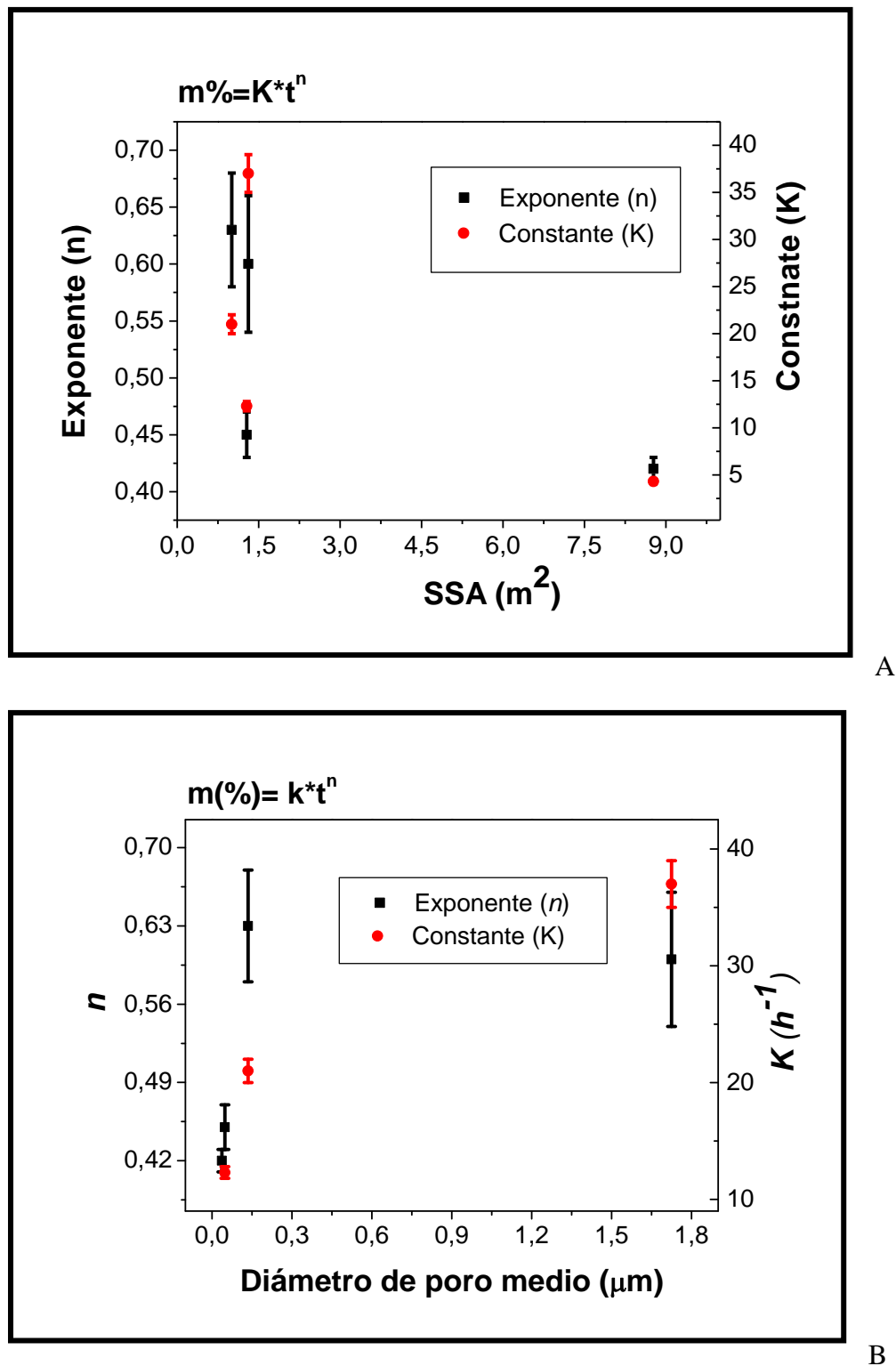


Figura 51. Relación del área específica (A) y el diámetro medio de poro (B) para los valores del exponente n y de la constante K de la ecuación de Korsmeyer-Peppas, en aquellos cementos a los que se les incorporó 100 mg/ml de vancomicina en su fase sólida.

3.1.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ANTIBIÓTICO INCORPORADO AL CEMENTO

La actividad biológica de la vancomicina, introducida en los cementos de fosfato cálcico dopados con silicio, se valoró colocando los cementos sobre placas inoculadas con *Staphylococcus Aureus* y se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas tras las que se incubaron a 37° C durante 24 horas. Para comprobar la sensibilidad de la cepa se incubó en una placa un disco de papel impregnado con vancomicina (30 µg). La actividad biológica se evaluó en función de la presencia de una zona de inhibición en el medio de cultivo de las bacterias entorno a la pastilla de cemento.

Cuando incubamos el material con 10 mg/ml de vancomicina, el material que obtuvo un halo de mayor diámetro fue el preparado con CFC sin dopar, siendo su halo de inhibición de $33,8 \pm 0,6$ mm (Figura 52). La diferencia con los otros tres materiales no fue muy significativa, $33,6 \pm 0,6$, $29,6 \pm 0,3$ y $31,5 \pm 0,2$ mm, para los cementos preparados con 20, 40 y 80% de Si-TCP, respectivamente (Figuras 53 y 54). El halo de inhibición menor fue para los cementos preparados con el 40% de Si-TCP. Los controles negativos, sin vancomicina, no presentaron halo de inhibición. El resumen de estos resultados puede verse en la Tabla 22 y la Figura 55.

Tabla 22: Media y DE del halo de inhibición bacteriana para los cementos preparados con β -TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP, incubando las pastillas durante 24 horas en vancomicina.

Material	Media (mm)	\pm DE
CFC	33,8	0,6
20% Si-CFC	33,6	0,6
40% Si-CFC	29,6	0,3
80% Si-CFC	31,5	0,2

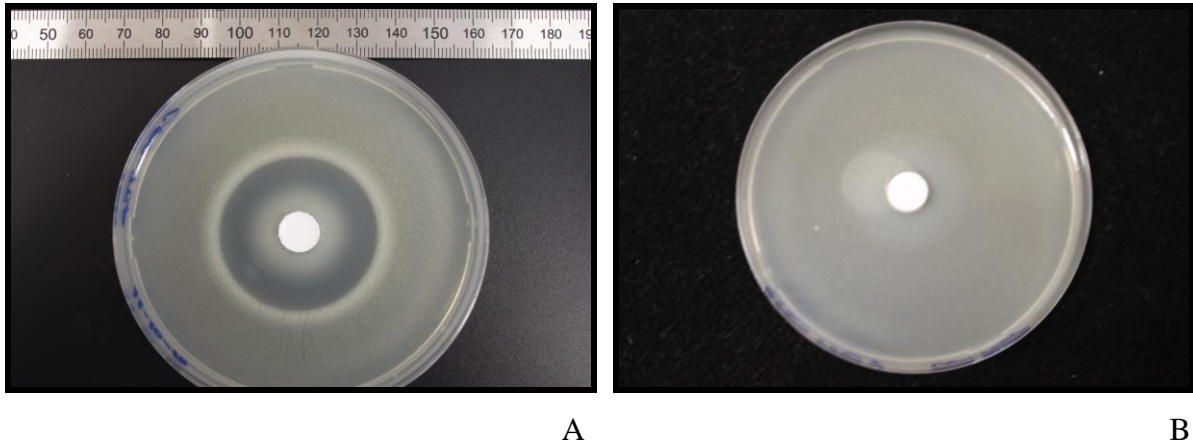


Figura 52. Imágenes del halo de inhibición bacteriana para el CFC. A: incubado 24 horas en vancomicina y B: control sin vancomicina.

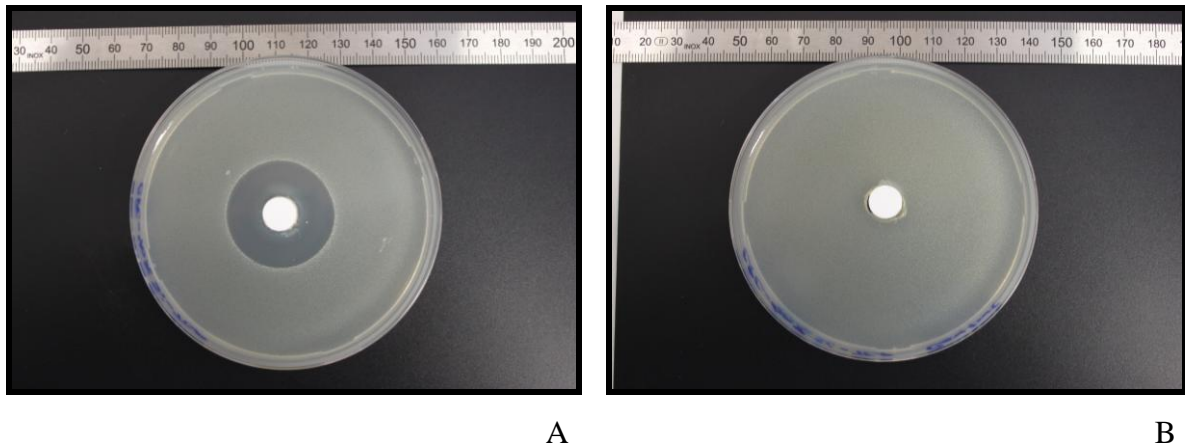


Figura 53. Imágenes del halo de inhibición bacteriana para el 40% Si-CFC. A: incubado 24 horas en vancomicina y B: control sin vancomicina.

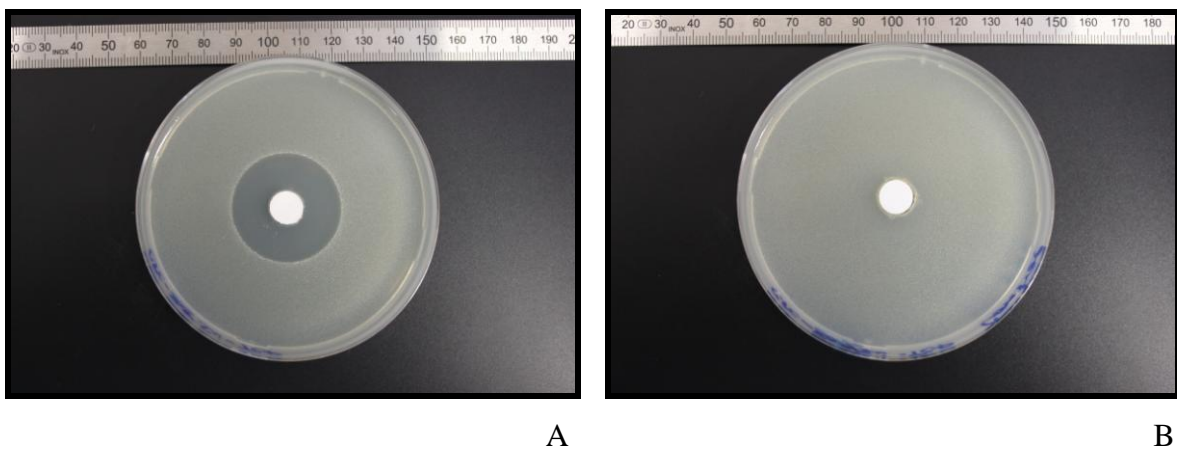


Figura 54. Imágenes del halo de inhibición bacteriana para el 80% Si-CFC. A: incubado 24 horas en vancomicina y B: control sin vancomicina.

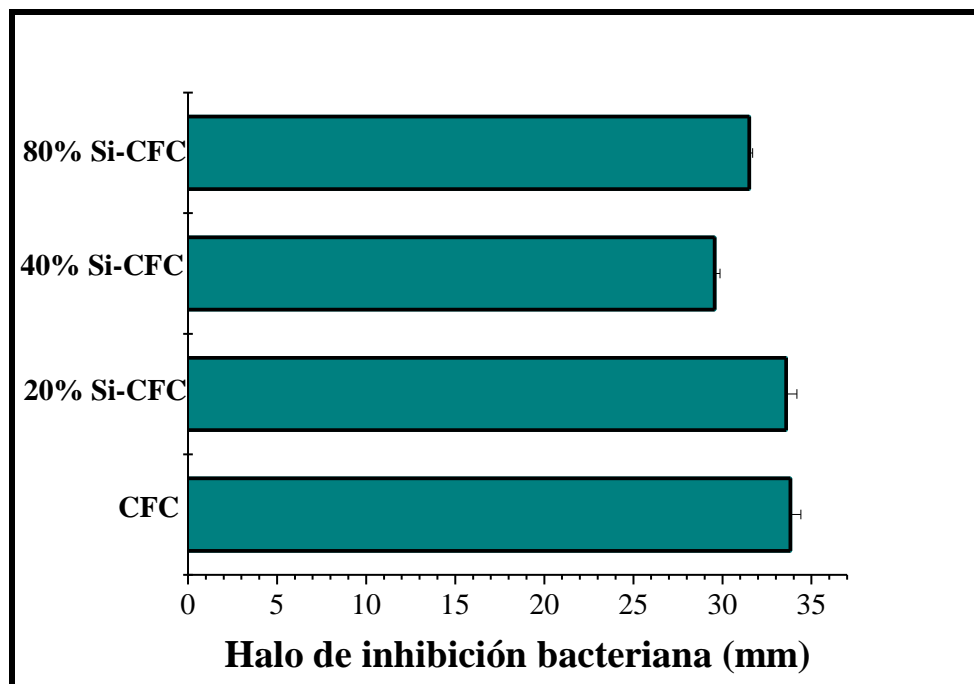


Figura 55: Gráfico de la media y DE del halo de inhibición bacteriana para los cementos: CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC, incubando las pastillas durante 24 horas en vancomicina.

Los cementos en los que se incorporó 100 mg de vancomicina en su fase sólida, experimentaron un menor diámetro de inhibición que con el anterior experimento. El material que obtuvo un halo de mayor diámetro fue el preparado con β -TCP sin dopar, al igual que en los materiales en los que se incubó la vancomicina, siendo su halo de inhibición de $16,9 \pm 0,3$ mm (Figura 56). La diferencia con los otros tres materiales tampoco fue muy significativa, $16,8 \pm 0,3$, $14,8 \pm 0,2$ y $15,8 \pm 0,1$ mm, para los cementos preparados con 20, 40 y 80% de Si-TCP, respectivamente (Figuras 57 y 58). El halo de inhibición menor fue para los cementos preparados con el 40% de Si-TCP, coincidiendo también con el estudio anterior. Los controles negativos, sin vancomicina, no presentaron halo de inhibición. El resumen de estos resultados puede verse en la Tabla 23 y la Figura 59.

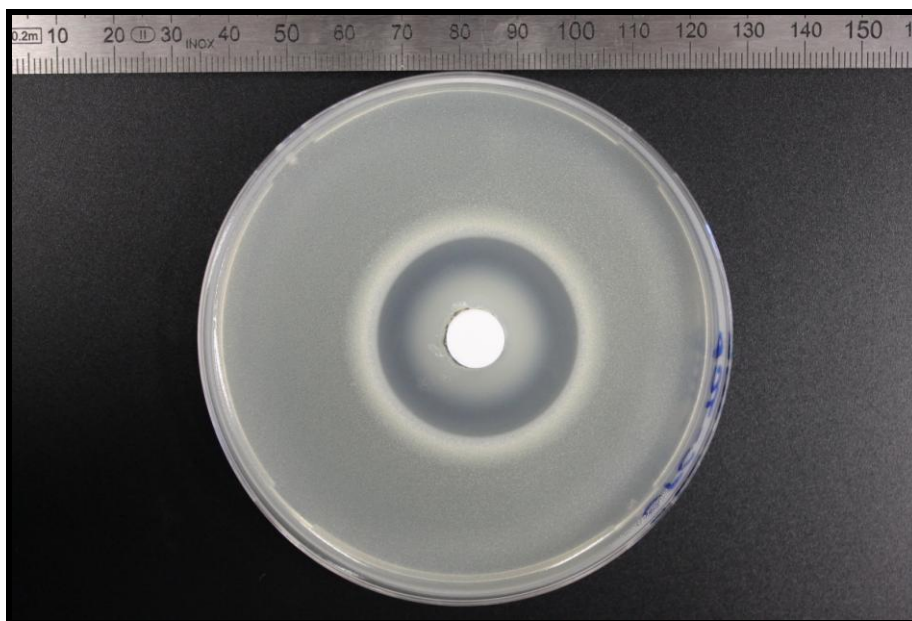


Figura 56. Imagen del halo de inhibición bacteriana para el CFC sin dopar. Introduciendo 100 mg/ml vancomicina en su fase sólida.

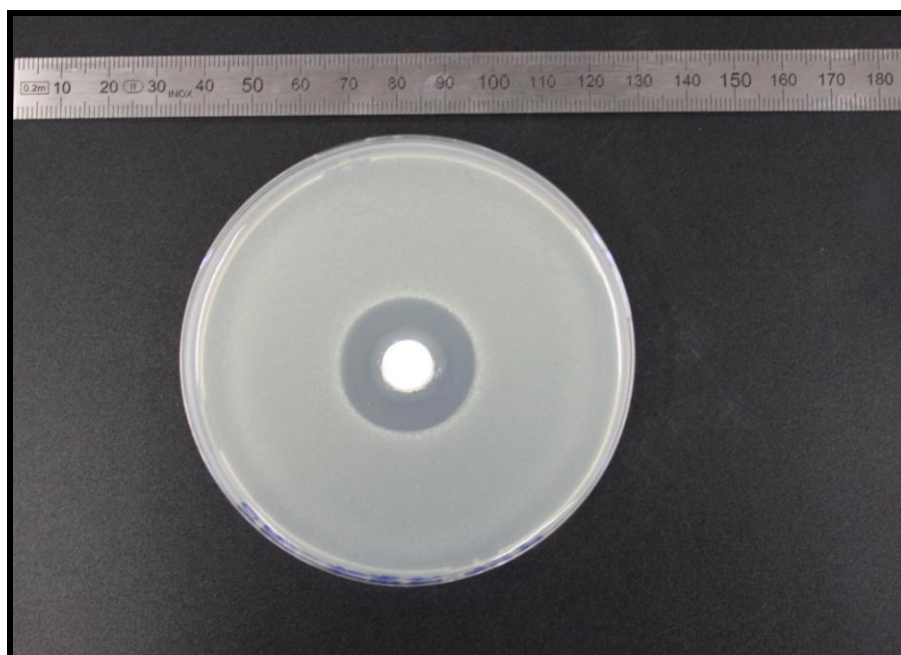


Figura 57. Imagen del halo de inhibición bacteriana para el 40% Si-CFC. Introduciendo 100 mg/ml de vancomicina en su fase sólida.

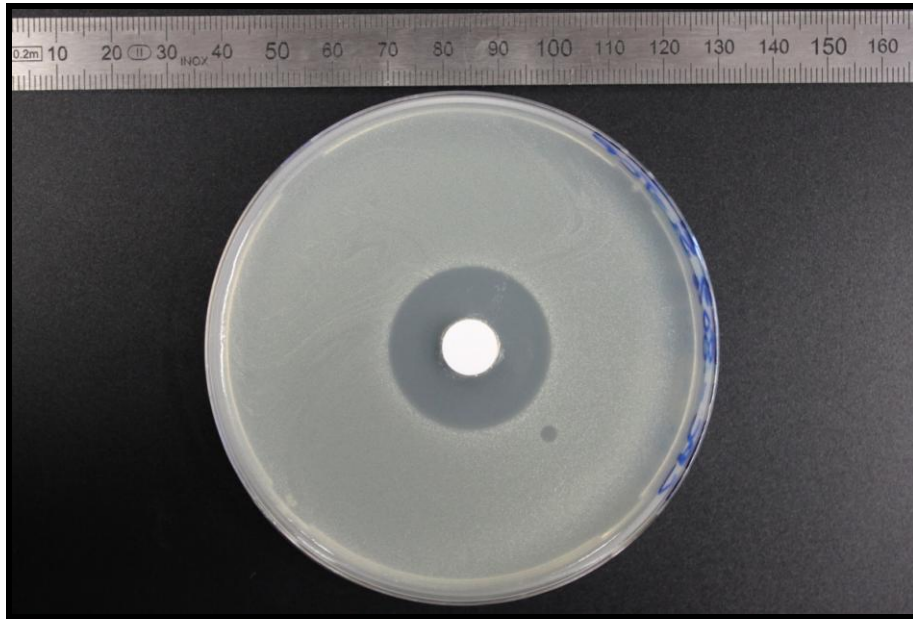


Figura 58. Imagen del halo de inhibición bacteriana para el 80% Si-CFC. Introduciendo 100 mg/ml vancomicina en su fase sólida.

Tabla 23: Media y DE del halo de inhibición bacteriana para los cementos preparados con β -TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP, incorporando 100k mg/ml de vancomicina en su fase sólida.

Material	Media (mm)	\pm DE
CFC	16,9	0,3
20% Si-CFC	16,8	0,3
40% Si-CFC	14,8	0,2
80% Si-CFC	15,8	0,1

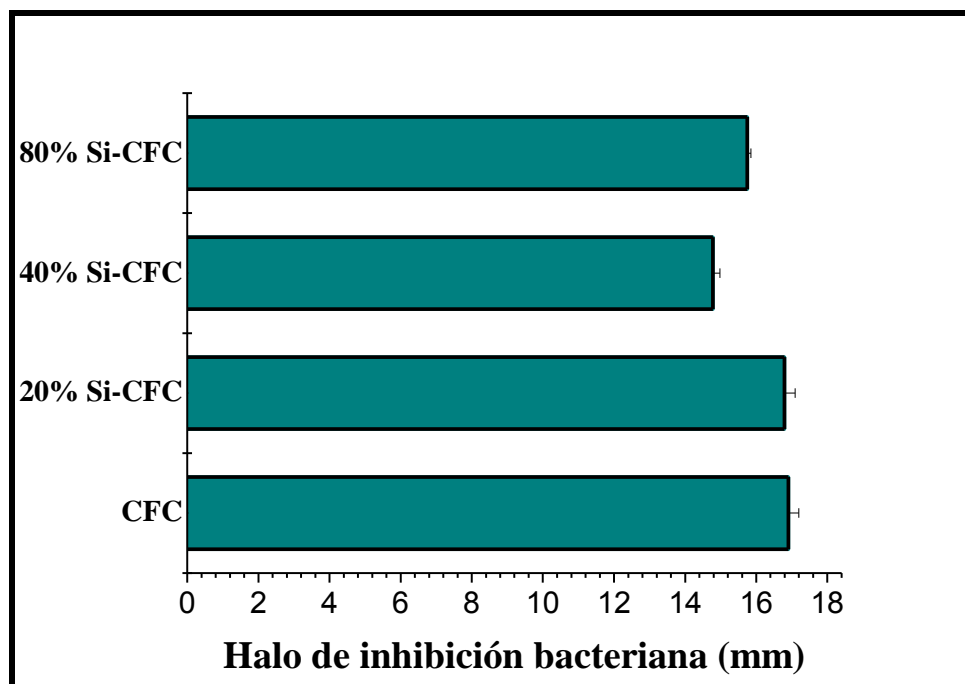


Figura 59: Gráfico de la media y DE del halo de inhibición bacteriana para los cementos: CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC, incorporando 100 mg/ml de vancomicina en su fase sólida

3.2 DISCUSSION DE LA EFICACIA DEL CEMENTO COMO MATRIZ PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

Los antibióticos administrados por vía sistémica, presentan la dificultad de conseguir una concentración eficiente del antibiótico en el lugar de la infección. Esto se atribuye a diferentes factores, como son: una vida media del antibiótico corta, la escasa circulación de la sangre en el área infectada y la toxicidad sistémica de los antibióticos a altas dosis. Además, la formación de un biofilm en las superficies desvascularizadas, protege a la bacteria del antibiótico, dificultando más el tratamiento. Esto implica, que los antibióticos se administren durante largos periodos de tiempo ^[194].

La posibilidad de administrar de forma local un fármaco, presenta la ventaja de aumentar la concentración *in situ*, que proporciona altas concentraciones del medicamento localmente, y disminuye la dosis sistémica, de este modo reduce los efectos secundarios asociados.

La incidencia de osteomielitis, es una de las complicaciones postquirúrgicas más habituales de la cirugía bucal, asociada, entre otros tratamientos, a la colocación de biomateriales implantables. Esta infección ósea puede alargarse fácilmente, debido a la escasa accesibilidad al lugar de la infección, la isquemia que se produce durante el proceso, la baja cicatrización del tejido infectado y el bajo flujo sanguíneo del hueso. Por ello, es necesario encontrar procedimientos para incorporar antibióticos en el propio implante, que actúen de forma local, reduciendo el riesgo de infección asociado a cualquier procedimiento quirúrgico. Por lo que su aplicación puede ser tanto para el tratamiento de infecciones óseas ya establecidas, como a nivel profiláctico ^[13].

En la bibliografía científica se describen una amplia variedad de sistemas de liberación controlada de fármacos, generalmente constituidos por una matriz polimérica o por diversos sustratos, a los que se les añade el fármaco por impregnación, que consiste en preparar disoluciones saturadas del medicamento en las que se sumergen los sustratos. De esta manera, un porcentaje elevado del fármaco queda adsorbido en la superficie del sustrato, lo que conduce a una rápida liberación del fármaco cuando se implanta en el organismo, mediante fenómenos de difusión. Cuando el material es muy poroso puede ser un método adecuado, pero en el caso de un material denso su eficacia será menor. Una opción, es la implantación de esferas de polimetacrilato de metilo (PMMA) cargadas con sulfato de gentamicina en el lugar de la infección. Sin embargo, no son reabsorbibles y deben ser retiradas quirúrgicamente al cabo de unos meses. Otra alternativa son los bloques de cerámica de HA o de β -TCP cargados con antibiótico. Pero su tasa de reabsorción es lenta, y no pueden ser conformados para adaptarse exactamente a la forma del defecto óseo. El sulfato dicálcico hemihidratado puede prepararse en forma de cemento, lo que ofrecería ciertas ventajas, sin embargo el inconveniente principal es su baja resistencia mecánica y su elevada velocidad de reabsorción. Por ello, en diferentes estudios Otsuka et al. ^[151], comenzaron a estudiar el potencial de los CFC como matrices para la liberación controlada de antibióticos, incorporando el fármaco bien en su fase líquida o en el polvo, lo que suponía una ventaja frente a las cerámicas, ya que el medicamento estaría distribuido en todo el volumen del material y no solo en su superficie ^[13].

En nuestros cementos, al incorporar los iones de silicio en los CFC se produjeron cambios estructurales, que nos podrían proporcionar una herramienta, para

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

controlar el uso de los cementos como un sistema de administración de medicamentos. Se decidió incorporar el fármaco mediante dos sistemas diferentes, por adsorción y en su fase sólida, para luego observar su liberación.

Se eligió la vancomicina como antibiótico, por ser altamente soluble y emplearse en la profilaxis de infecciones nosocomiales de hueso por *Staphylococcus Aureus*. Además, no muestra ninguna interacción fuerte con la matriz de fosfato de calcio [194, 195, 196, 197].

El estudio de la adsorción de la vancomicina en los cementos, muestra que la cantidad de droga adsorbida aumenta, al aumentar la concentración de vancomicina en el medio de incubación. Esto coincide con los resultados de estudios anteriores, en los que la cantidad de droga adsorbida, dependía de su concentración en el líquido, que penetraría por los poros del cemento [3, 180]. Además, como muestra la Figura 45, cuanto mayor era el porcentaje de silicio en los cementos dopados, la eficacia era significativamente mayor, a la hora de captar el antibiótico del medio de incubación. Esta efectividad podría estar relacionada con el aumento del área específica de los cementos dopados con silicio, aumentando así el número de sitios de disponibles para unirse con el antibiótico. Por otro lado, los cambios estructurales que se producen en los cementos dopados, como la precipitación de HA y C-S-H, podrían contribuir también a mejorar la forma de captar el antibiótico, ya que se ha demostrado que la HA obtiene mejores resultados a la hora de adsorber la vancomicina, que cuando se emplea la brushita [165].

La sustitución con Si afectó significativamente también al perfil de liberación de la droga, como puede verse en los gráficos de las Figuras 46 A, 46 B y 47, y al mecanismo que lo controla. El perfil típico de liberación de los cementos de brushita, cuando el fármaco se incubaba, estaba compuesto por una liberación inicial rápida, que iba disminuyendo su velocidad hasta estabilizarse y adquirir una forma constante en el tiempo [180, 198], siguiendo una cinética de primer orden, en la cual la velocidad de disolución está en función de la concentración del fármaco disuelto [199]. Cuando se incubaron las muestras en 5 mg/ml de vancomicina el perfil de la liberación del fármaco del cemento preparado con 40% Si-TCP, fue similar al del cemento de brushita. Sin embargo para el cemento preparado con 80% Si-TCP, este perfil fue casi lineal y con

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

una velocidad constante (Figura 46 A y Tabla 16), cambiando a una cinética de orden cero, en el que la velocidad de liberación es independiente de la concentración ^[200].

La velocidad de liberación del medicamento en todas las concentraciones de antibiótico (5, 10 y 20 mg/ml) fue más lenta, para los cementos preparados con 40% y 80% Si-TCP, que para el cemento de brushita sin sustituir. Al aumentar la cantidad de la vancomicina adsorbida en los cementos, aumentó tanto la velocidad de la liberación, como el total de fármaco liberado (Figura 46 A, 46 B, 47 y Tabla 16). Todos los cementos siguieron una cinética de primer orden, excepto los cementos preparados al 80% de Si-TCP, cuando se incubaban a 5 y 10 mg/ml de vancomicina, que siguieron una cinética de orden cero.

El mecanismo de liberación de la droga se obtuvo mediante el cálculo del modelo de Peppas, que es uno de los modelos más utilizados para describir el mecanismo de liberación de fármacos ^[200]. Este modelo se basa en la liberación del fármaco mediante sistemas poliméricos. Sin embargo, también se ha aplicado a la liberación de sistemas cerámicos porosos, especialmente cuando el mecanismo de liberación es desconocido ^[193]. La difusión, fue el mecanismo de liberación mayoritario para los distintos tipos de cemento, como muestran los resultados de la Tabla 16. Tan solo las muestras de cemento preparadas con 80% Si-TCP, cuando se incubaban a 10 mg/ml, siguieron un mecanismo de transporte anómalo, al encontrarse un valor de n entre 0.45 y 0.89. En el caso de los cementos incubados en 20 mg/ml de vancomicina, el perfil de liberación del β -TCP no se pudo calcular, ya que en la primera media hora se había liberado más del 60% de la droga (Tabla 16).

El porcentaje de liberación fue más lento en los cementos sustituidos con Si, esto puede estar relacionado con el descenso del diámetro de poro de estos cementos, de un rango micrométrico 1,7 μm , en los cementos con bajo porcentaje de Si (10% Si-TCP), a uno nanométrico 0,02 μm , en los cementos con alto contenido en Si (60% Si-TCP). Lo que atribuye una mayor tortuosidad a la matriz de cemento, siendo un factor de control de la difusión ^[200]. También podría verse influenciado por la composición estructural de la matriz de cemento, que muestra principalmente la presencia de brushita, C-S-H e HA. La HA ya ha mostrado en estudios anteriores, una liberación más lenta de la vancomicina que la brushita, o la monetita ^[180, 201].

Otro factor a tener en cuenta, es la tasa de degradación de la matriz, que es mucho menor que la tasa de liberación del fármaco. Por lo que la liberación del fármaco sucede por difusión, a través de la matriz del biomaterial, y no por la degradación de la misma ^[201]. Sin embargo los cementos de brushita tienen un porcentaje de degradación mayor que los de apatita. Algunos artículos hacen referencia a la utilización de polímeros para alargar estos tiempos de liberación ^[202]. El resultado que hemos obtenido, con los cementos preparados al 80% de Si-TCP, son de gran interés ya que hemos logrado sintetizar un CFC con un perfil de liberación prácticamente lineal, mucho más lento y gradual.

El número de monocapas de vancomicina que se forman sobre las pastillas de cemento puede ayudar a comprender la forma de liberación del antibiótico. Al analizar los resultados de la Tabla 17 vemos que el número de capas formadas aumentan, tanto al aumentar la concentración del antibiótico, como al aumentar el SSA de los cementos. Así, las pastillas de CPC sustituidas con el 80% Si llegaron a formar hasta casi 7 capas cuando se incubaban en 20 mg/ml, a diferencia del control, que con la misma concentración de antibiótico formó casi 2. La interacción de la primera capa con la superficie de la pastilla de CPC es más fuerte, ya que se trata de un enlace químico, y tarda más en liberarse respecto a la unión de una segunda capa. La unión entre capas de antibiótico, se produce mediante enlaces de Van der Waals, más débiles, por lo que su liberación será mucho mas rápida. Esto explicaría el aumento en la velocidad de liberación en aquellos cementos incubados con una mayor concentración del fármaco.

Los cementos de fosfato cálcico poseen además la capacidad de introducir el medicamento a través de todo el volumen del material, introduciendo la droga en una de sus dos fases, por lo que tendríamos de un sistema diferente para la incorporación del fármaco. A diferencia de las cerámicas de fosfato cálcico, que solo pueden emplear sistemas de adsorción, donde la droga permanece en la superficie del material, liberando el fármaco de forma mucho más rápida. Los procesos que permiten incluir antibióticos durante las etapas de fabricación de los materiales de regeneración, se deben realizar a temperaturas inferiores a la descomposición del fármaco. Por ello, los materiales cerámicos no son una buena opción, sin embargo los cementos al fraguar a temperatura ambiente, si pueden ser una buena alternativa para incorporar el antibiótico

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

a los biomateriales, ya que permiten que el fármaco este en todo el volumen del material, facilitando una liberación más prolongada en el tiempo. También influirán otros factores como la porosidad, cristalinidad y tasa de reabsorción del material ^[201].

Es necesario verificar que la adición del fármaco no interfiere en la reacción de fraguado, ni modifica propiedades físico-químicas de los cementos o su comportamiento reológico ^[13]. Cuando se introdujo el antibiótico en la fase sólida de los cementos dopados con silicio, disminuyeron sus propiedades mecánicas, especialmente con aquellos materiales al 20 y 40% de Si-TCP; y aumentó el tiempo de fraguado, excepto en el de 40% de Si-TCP, que se mantuvo prácticamente igual, como muestra la Tabla 18. Esto coincide con otros estudios realizados por Takechi et al. ^[203], Ratier et al. ^[204] y Hamanashi et al. ^[205] que al incorporar el antibiótico en la fase sólida de sus cementos, tendían también a incrementar el tiempo de fraguado y reducir las propiedades mecánicas. Lo cual, puede ser debido a cambios en la estructura del cemento, incrementando su porosidad o inhibiendo la reacción de fraguado. Por otro lado, es importante tener en cuenta la solubilidad del antibiótico empleado, ya que este se disolverá más rápido en la fase líquida del cemento ^[201]. Al incorporar el antibiótico en su fase sólida podemos introducir dosis mayores de antibiótico, conservando una velocidad de liberación muy lenta y prolongada en el tiempo.

La velocidad de liberación de la vancomicina en los cementos preparados con β -TCP, 20% Si-TCP y 40% de Si-TCP tanto a bajas dosis de vancomicina, 8,4 mg (Figura 48 y Tabla 19), como a altas dosis de vancomicina, 100 mg (Figura 49 y Tabla 20), se caracterizaron por una liberación inicial brusca que con el paso del tiempo disminuían su velocidad hasta estabilizarse. Sin embargo los cementos preparados con el 80% de silicio mostraron una velocidad de liberación más lenta y constante. Al igual que con los cementos a los que se les incubó en 5 y 10 mg/ml de vancomicina. Por lo que la cinética de liberación, cambió con los cementos dopados al 80%, de una cinética de primer orden, a una de orden cero.

El mecanismo de liberación según el modelo de Korsmeyer-Peppas fue de difusión para todos los cementos a los que se les incorporó 8,4 mg de vancomicina en su fase sólida y para los cementos dopados con 40% de silicio con 100 mg de vancomicina. El resto de cementos dopados (β -TCP, 20% Si-TCP, y 80% Si-TCP) a los

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

que se les incorporó 100 mg de vancomicina tuvieron un mecanismo de transporte anómalo.

Los nuevos cementos, nos proporcionan por tanto una herramienta eficaz para controlar, tanto el porcentaje de liberación de fármaco en relación a la dosis cargada, como seleccionar la cinética de liberación, de orden cero o de primer orden, en función del porcentaje de silicio.

Las Figuras 50 y 51 muestran la relación que existía entre el diámetro del poro y el área de superficie del cemento, y los valores de K y n de la ecuación (5), a través de la cual se analizaron los cambios de cinética de los cementos dopados con silicio. Podemos observar que el aumento en el área de superficie y el descenso del diámetro medio de poro producía un descenso de la constante K y del exponente n , por tanto de la velocidad de liberación del fármaco. Esta dependencia ha sido demostrada por Otsuka et al. en varios trabajos ^[206, 207, 208, 209] y confirmada por otros autores ^[199, 210, 211].

La actividad biológica de la vancomicina manifestó la eficacia de los CPC como vehículo para el transporte de medicamentos, y su eficacia a la hora de liberarlos en un cultivo con *Staphylococcus Aureus*. Si se presentaron diferencias cuando cambiaba el sistema de introducir el antibiótico, incubación o en su fase sólida, pero no entre las distintas concentraciones de silicio. Las pastillas reparadas con vancomicina mediante mecanismo de adsorción obtuvieron un halo mayor en torno a 30 mm (Figura 55 y Tabla 22), comparado con que aquellas a las que se les incorporaron la vancomicina en su fase sólida, que formaron halos de 16 mm aproximadamente (Figura 59 y Tabla 23). Esto se atribuye a que la liberación del fármaco, incorporado mediante mecanismos de adsorción, es mucho más rápido que cuando introducimos dicho fármaco en su fase sólida, que proporciona una liberación más lenta, al encontrarse el medicamento en todo el volumen del cemento y no solo en su superficie ^[13, 201].

Por lo que podemos concluir, que los cementos dopados con silicio, demostraron su eficacia como portadores de antibióticos, ya que son eficientes matrices liberadoras de vancomicina. Los cementos dopados con silicio lograron producir cambios en la cinética de liberación del fármaco en función de la concentración de silicio, consiguiendo dosis terapéuticas durante un periodo de tiempo mayor y de forma más

Resultados y discusión: Liberación de medicamentos

constante. La actividad biológica de la vancomicina muestra la capacidad de estos cementos como sistema de suministro de fármacos.

4. ESTUDIO *IN VIVO* DE REGENERACIÓN ÓSEA

Una vez realizado el test de citocompatibilidad y debido a los buenos resultados obtenidos se procedió al estudio *in vivo* sobre calotas de conejo, para valorar la capacidad de regeneración ósea de los cementos dopados con silicio. Se escogieron aquellos cementos dopados al 10, 20, 40 y 80% de silicio y se estableció como control los cementos sin dopar.

4.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO *IN VIVO* DE REGENERACIÓN ÓSEA

En cada defecto óseo se colocó el cemento en forma granulada en los defectos creados. Ningún conejo tuvo complicaciones quirúrgicas durante la cirugía, ni en las 8 semanas consecutivas hasta su sacrificio. Al extraer los fragmentos de calota, que contenían los distintos materiales, se apreciaba a nivel macroscópico diferencias entre los distintos materiales. En los materiales con poco contenido en silicio se notaban perfectamente los gránulos de material remanente (Figuras 60 y 61). Sin embargo en la Figura 62 se observa que prácticamente no se distinguen los gránulos del cemento con el 80% silicio. El tacto también variaba de unas muestras a otras, teniendo los materiales que no contenían sílice o en cantidades muy pequeñas, una consistencia más blanda, respecto a los de mayor contenido en silicio, que presentaba una mayor dureza a la presión digital.



Figura 60: Fragmento de calota cara externa donde se encuentra el material sustituido con el 20% Si-CFC a las 8 semanas.



Figura 61: Fragmento de calota cara externa donde se encuentra el material sustituido con el 40% Si-CFC a las 8 semanas.

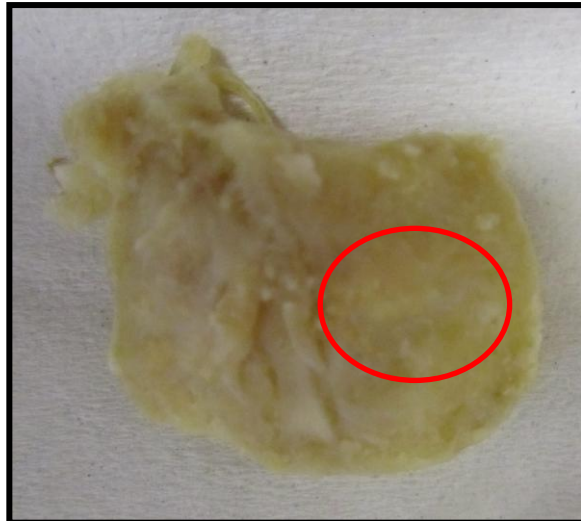


Figura 62: Fragmento de calota cara externa donde se encuentra el material sustituido con el 80% Si-CFC a las 8 semanas.

4.1.1 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Para realizar el análisis histológico se tiñeron las muestras con azul de toluidina. Al emplear esta tinción se verá el hueso neoformado de color azul, el material remanente marrón intenso casi negro, el hueso mineralizado en lila y el tejido conjuntivo (osteoide) en azul pálido.

En las fotografías correspondientes a los cortes histológicos puede apreciarse que la interacción entre el material y el medio fue buena, se produjo la formación de

Resultados y discusión: Estudio *in vivo* de regeneración ósea

hueso nuevo alrededor de los gránulos de material remanente, estableciéndose puentes óseos entre los gránulos de cemento. No se detectó la formación de tejido fibroso en ninguna de las muestras.

A continuación se expondrán los datos obtenidos de cada material:

Defectos vacíos (control negativo)

En los cortes histológicos sin ningún tipo de injerto, puede apreciarse que el defecto no se regeneró de manera espontánea, permaneciendo prácticamente la totalidad de este vacío. La reparación se produjo con tejido fibroso y una formación muy pequeña de tejido óseo. En la Figura 63, al trabajar con un aumento de 2X, puede observarse la formación de una pequeña banda de tejido óseo en la zona más apical. Al tratarse de defectos de espesor total no pudieron regenerar por si mismos lo que indica que este modelo es eficaz para utilizarlo como control negativo.

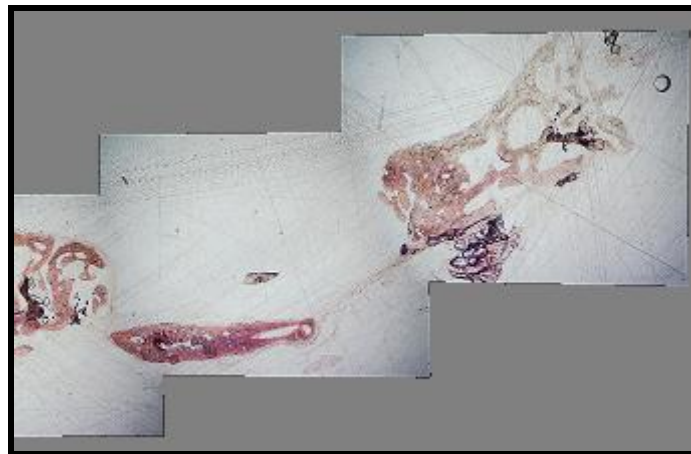


Figura 63: Corte histológico a 2X de los defectos sin ningún tipo de material a las 8 semanas.

CFC preparado con β -TCP

En los cortes histológicos con cementos preparados con β -TCP sin sustituir, pudimos distinguir hueso nuevo formado de color azul, en torno a gránulos de cemento sin reabsorber. El material remanente se observa de color muy oscuro, prácticamente negro, como puede apreciarse en la Figura 64 y 65 con un aumento de 2X. En la Figura 66 A, al trabajar con un objetivo de 10X, se pudo percibir mejor los puentes óseos que

se establecían entre los gránulos de cemento. La incorporación del material promovió la neoformación ósea con una media de $13 \pm 1\%$, mientras que la cantidad de material remanente fue de $52 \pm 7\%$ (Tabla 24 y Figura 77). En la figura 66 B se valora la formación de hueso dentro de uno de los gránulos parcialmente reabsorbidos. No se identificó tejido fibroso en ninguna de las muestras y en todas las imágenes puede observarse que la interacción entre el material y el hueso neoformado fue buena.

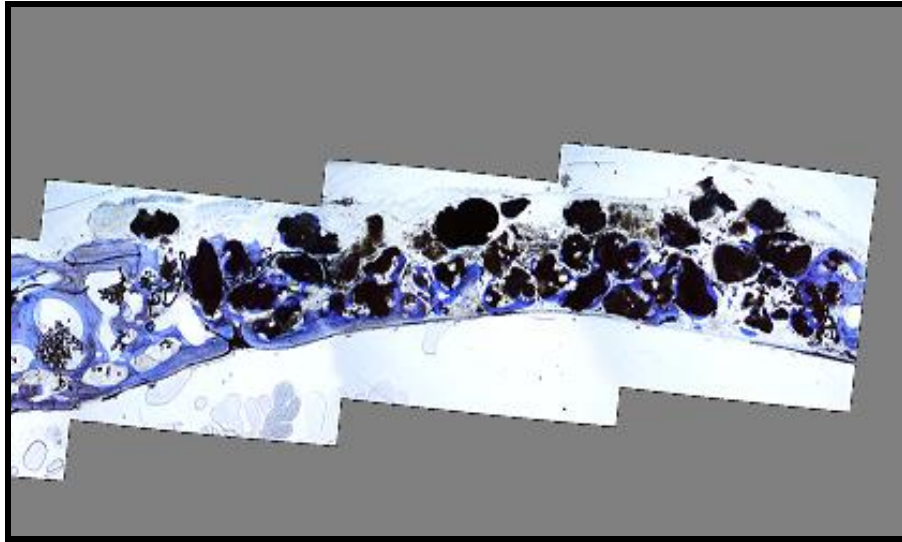


Figura 64: Corte histológico de los defectos con los CFC sin dopar con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

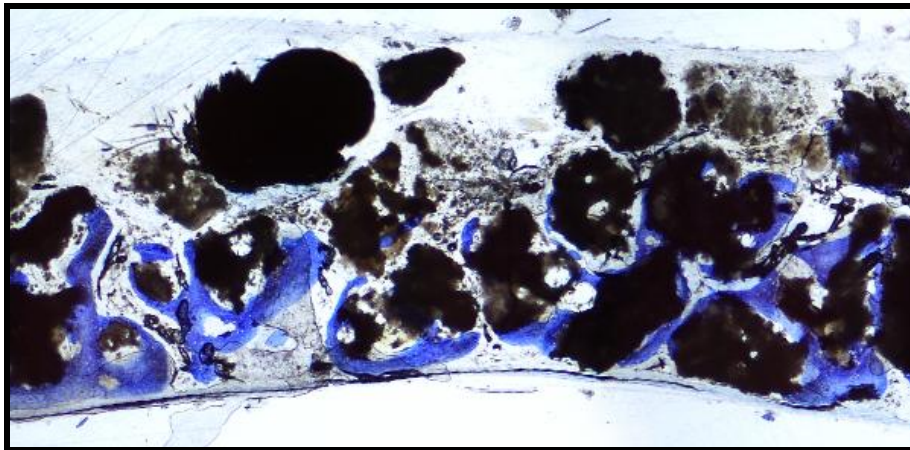


Figura 65: Corte histológico del CFC sin dopar con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

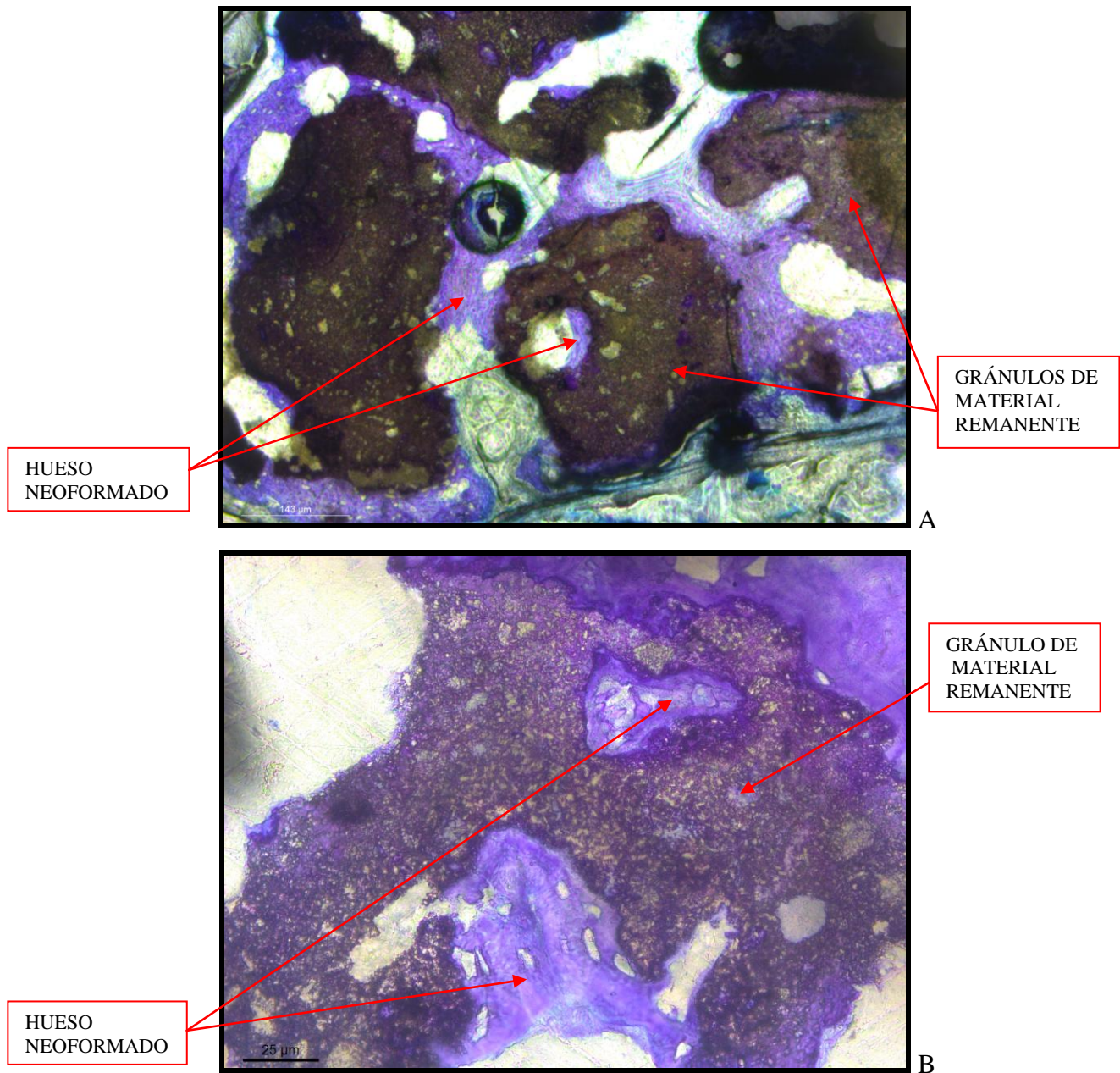


Figura 66: Corte histológico del CFC sin dopar con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas A: a 10X y B: a 40X.

CFC preparado con 10% Si-TCP

En este material aparece una mayor cantidad de tejido óseo rodeando los gránulos del cemento remanente, respecto al material anterior (CFC sin dopar), como puede verse en las Figuras 67 y 68. La media de hueso neoformado fue de $24 \pm 5\%$, mayor respecto a los que no contenían silicio, que era de $13 \pm 1\%$. Mientras que la cantidad de material remanente fue menor respecto a los cementos sin dopar ($52 \pm 7\%$), siendo la media de $50 \pm 7\%$ (Tabla 24 y Figura 77). En la Figura 69 A, cuando

Resultados y discusión: Estudio *in vivo* de regeneración ósea

ampliábamos la imagen con un objetivo de 10X, pudieron apreciarse los puentes óseos entre los gránulos de cemento. Y en la Figura 69 B y 69 C, con un objetivo de 40X, se observa la perfecta interacción entre el material y el hueso neoformado alrededor del gránulo de cemento.

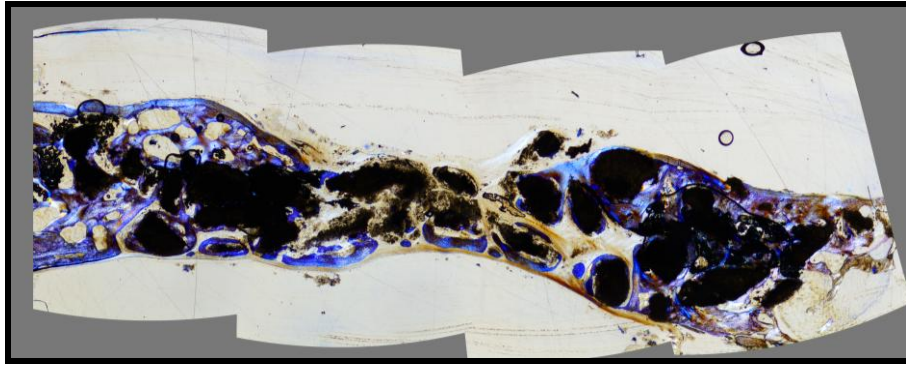


Figura 67: Corte histológico de los CFC al 10% de silicio con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

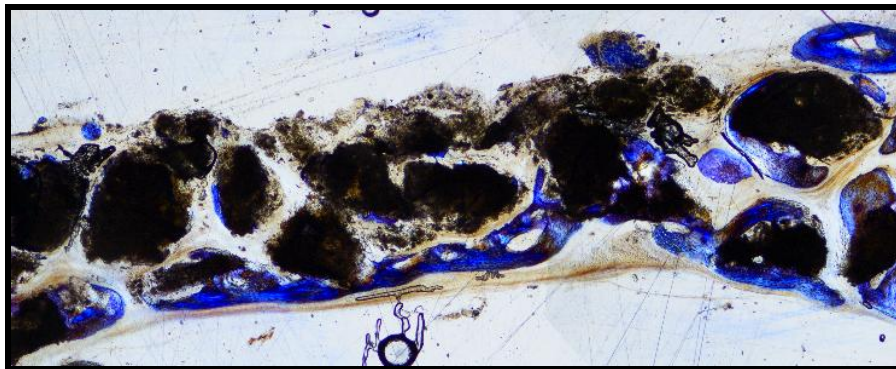


Figura 68: Corte histológico de los CFC al 10% de silicio con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

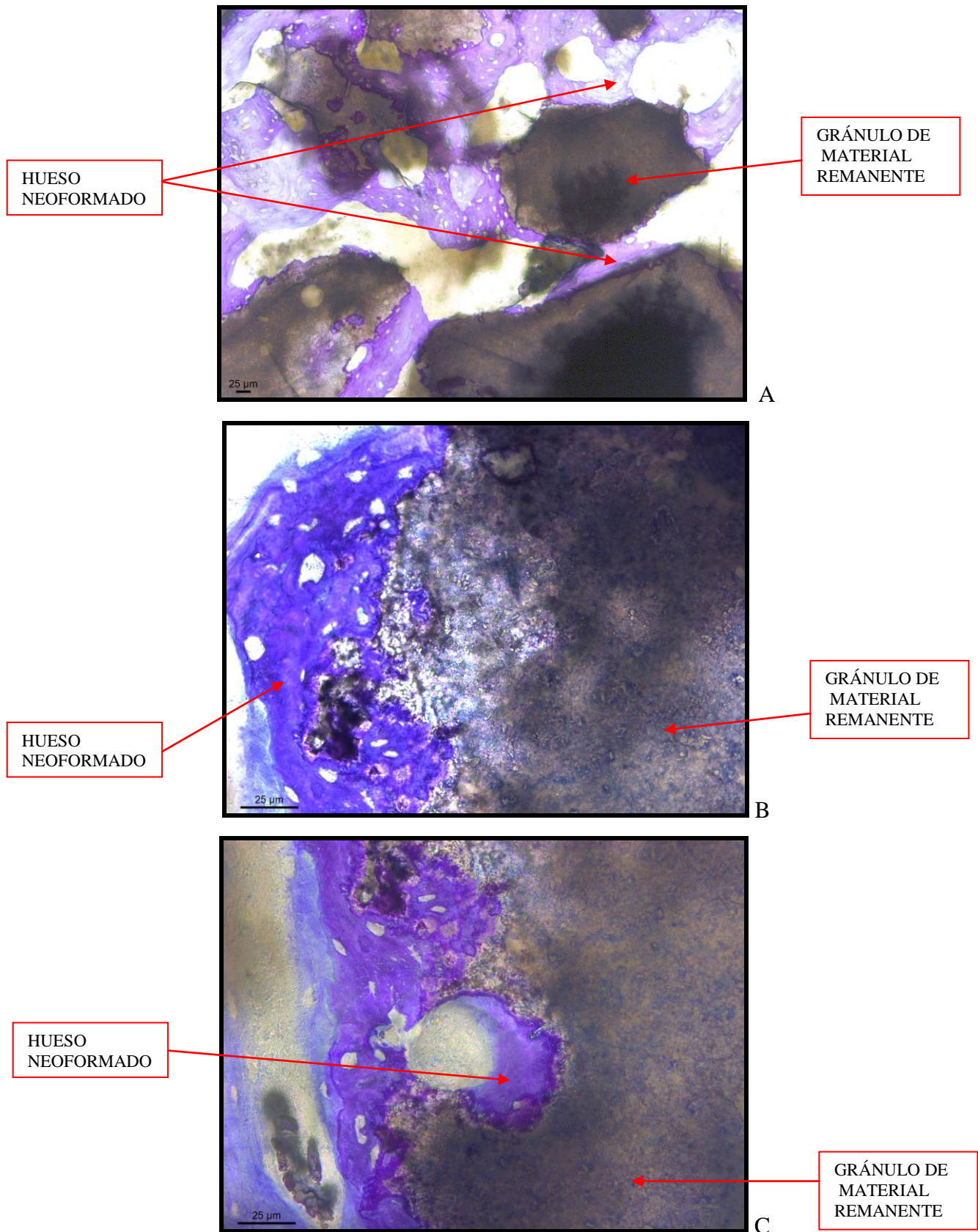


Figura 69: Corte histológico del 10% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas A: a 10X, B y C: a 40X.

CFC preparado con 20% Si-TCP

La media de material remanente de los cementos preparados con el 20% de Si-TCP fue de 52 ± 6 . Este valor es prácticamente igual al de los cementos sin dopar (52 ± 7 %), pero aumenta levemente respecto a los cementos preparados con el 10% de Si-TCP (50 ± 7 %). La Figura 70 pertenece a uno de los cortes histológicos del 20% Si-CFC, en él puede apreciarse la buena interacción del material con el medio. Mientras que la media de hueso neoformado fue de 16 ± 6 %, mayor en comparación con los cementos sin silicio (13 ± 1 %), y menor respecto a los preparados al 10% de Si-TCP (24 ± 5 %), como puede observarse en la Tabla 24 y la Figura 77. La Figura 71 A con un objetivo 10X muestra la formación de los puentes óseos entre los gránulos de cemento y la 71 B como se va degradando uno de los gránulos de cemento que es sustituido por hueso nuevo.



Figura 70: Corte histológico del 20% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

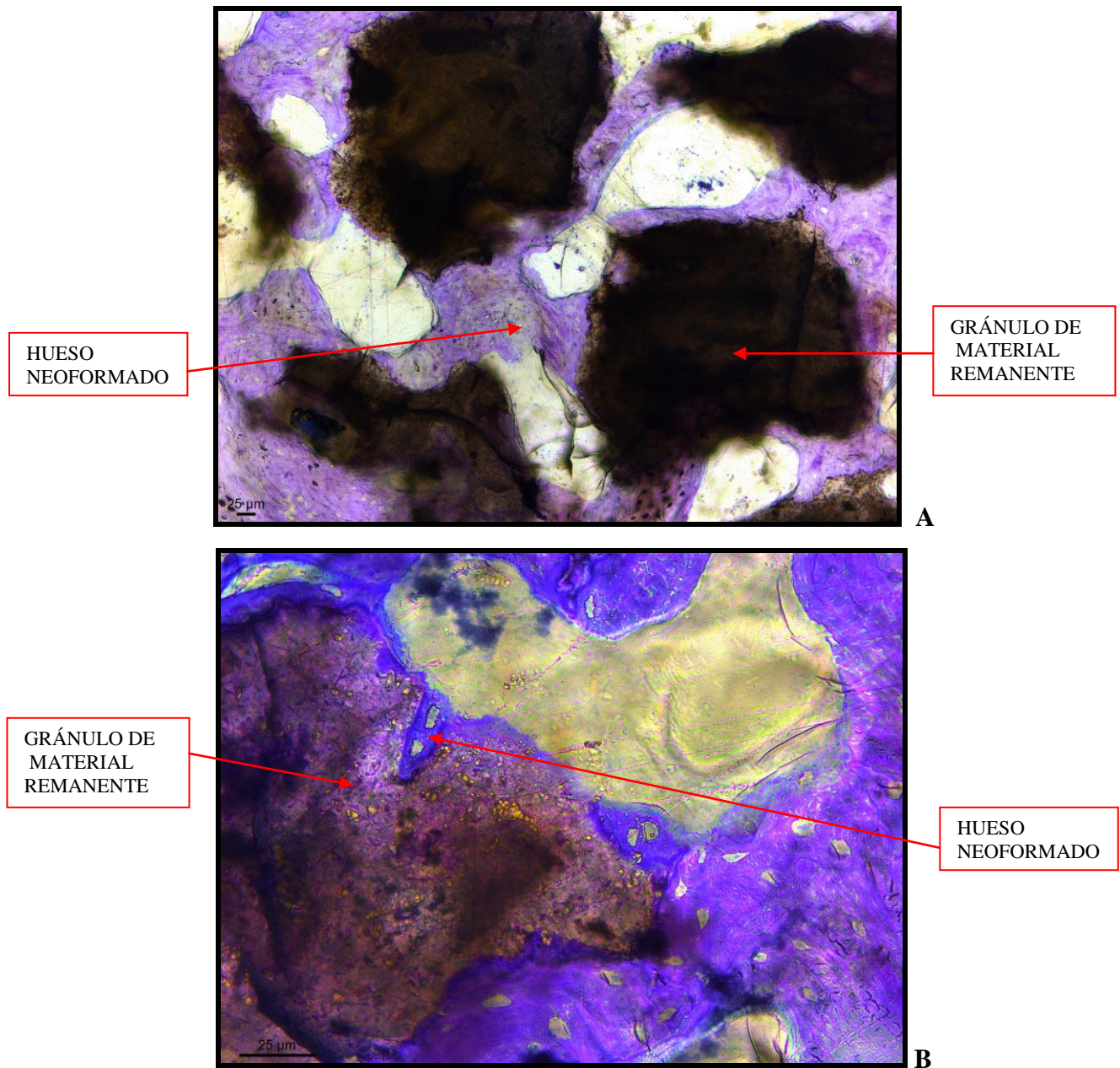


Figura 71: Corte histológico del 20% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas A: a 10X y B: 40X.

CPC preparado con 40% Si-TCP

La media del material remanente de los cementos preparados con el 40% de Si-TCP fue de $63 \pm 8\%$. Este valor es mayor con respecto a los materiales anteriores $52 \pm 7\%$, $50 \pm 7\%$ y $52 \pm 6\%$ para los cementos sin dopar, dopados al 10 y 20% de silicio respectivamente. En la Figura 72 se puede apreciar que hay una gran cantidad de material remanente y en la Figura 73 los puentes óseos entre los gránulos de cemento. La media de hueso neoformado fue de $17 \pm 6\%$ este dato es similar a los cementos

Resultados y discusión: Estudio *in vivo* de regeneración ósea

dopados al 20% de silicio ($16 \pm 6\%$), la formación de hueso siguió siendo mayor en comparación con los cementos sin dopar ($13 \pm 1\%$), pero menor que la de los cementos preparados al 10% de Si-TCP ($24 \pm 5\%$). Estos datos pueden verse en la Tabla 24 y la Figura 77.

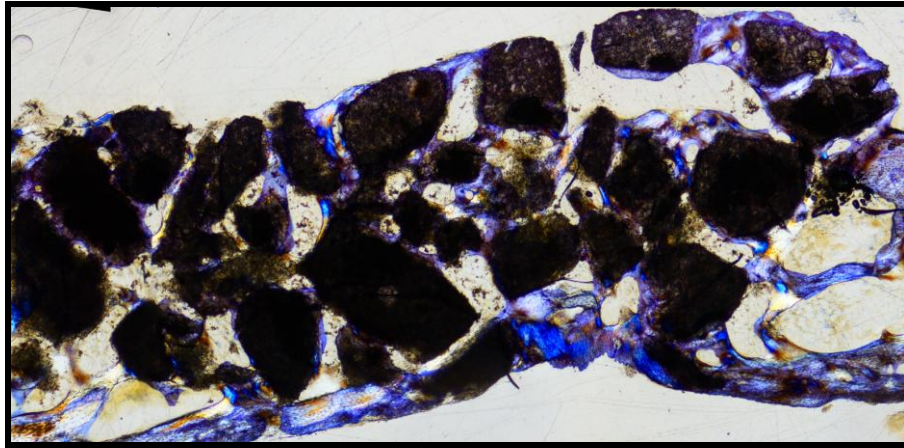


Figura 72: Corte histológico del 40% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

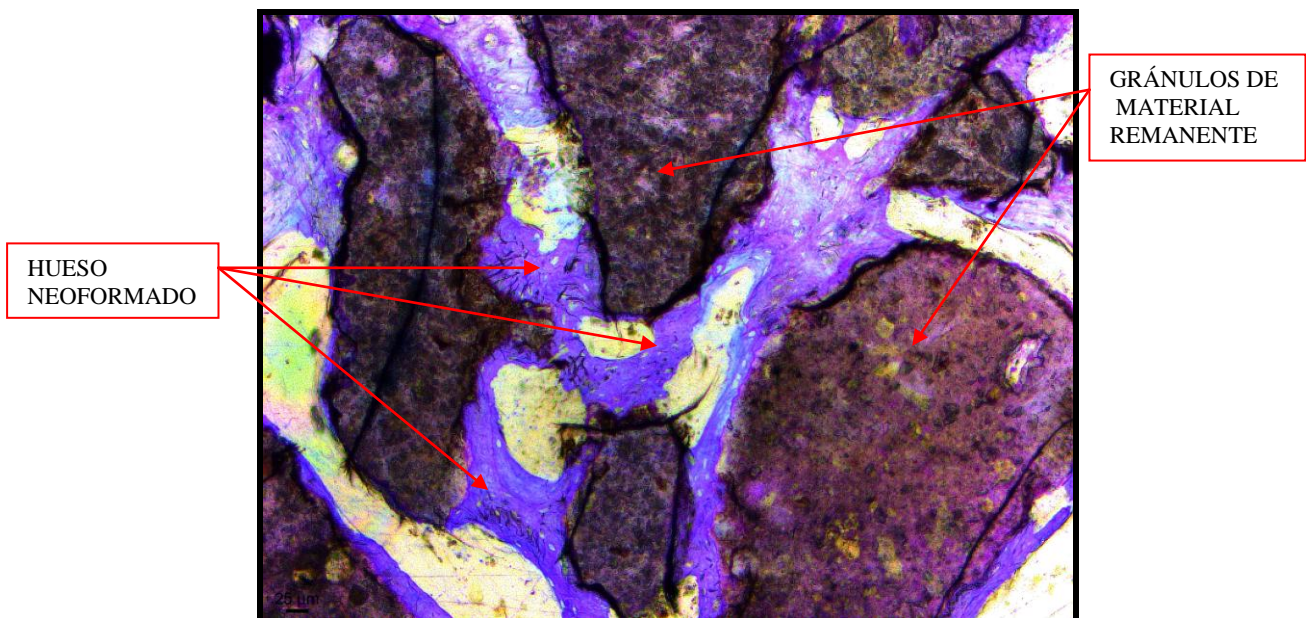


Figura 73: Corte histológico del 40% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 10X.

CPC preparado con 80% Si-TCP

Los cementos preparados al 80% de Si-TCP no presentaron prácticamente reabsorción del material. Siendo la media del material remanente de $78 \pm 6\%$. En las Figuras 74 A y 74 B se aprecia la gran cantidad de gránulos que permanecen sin reabsorber, lo que indica una reabsorción más lenta de este cemento. Este material fue el que obtuvo un mayor porcentaje de material remanente en los cortes histológicos, respecto al resto de materiales, $52 \pm 7\%$, $50 \pm 7\%$, $52 \pm 6\%$ y $63 \pm 8\%$ para los cementos sin dopar, dopados al 10, 20 y 40% de silicio respectivamente (Tabla 24 y Figura 77). En la Figura 75 se aprecian la formación de hueso entorno a los gránulos reabsorbidos, así como puentes óseos entre los gránulos del material (Figura 76), demostrando que la interacción del biomaterial fue buena. La media de hueso neoformado fue de $13 \pm 3\%$, prácticamente igual en comparación con los cementos sin dopar $13 \pm 1\%$ y menor respecto a los cementos dopados al 10, 20 y 40% de silicio, $24 \pm 5\%$, $16 \pm 6\%$ y $17 \pm 6\%$, respectivamente (Tabla 24 y Figura 77).

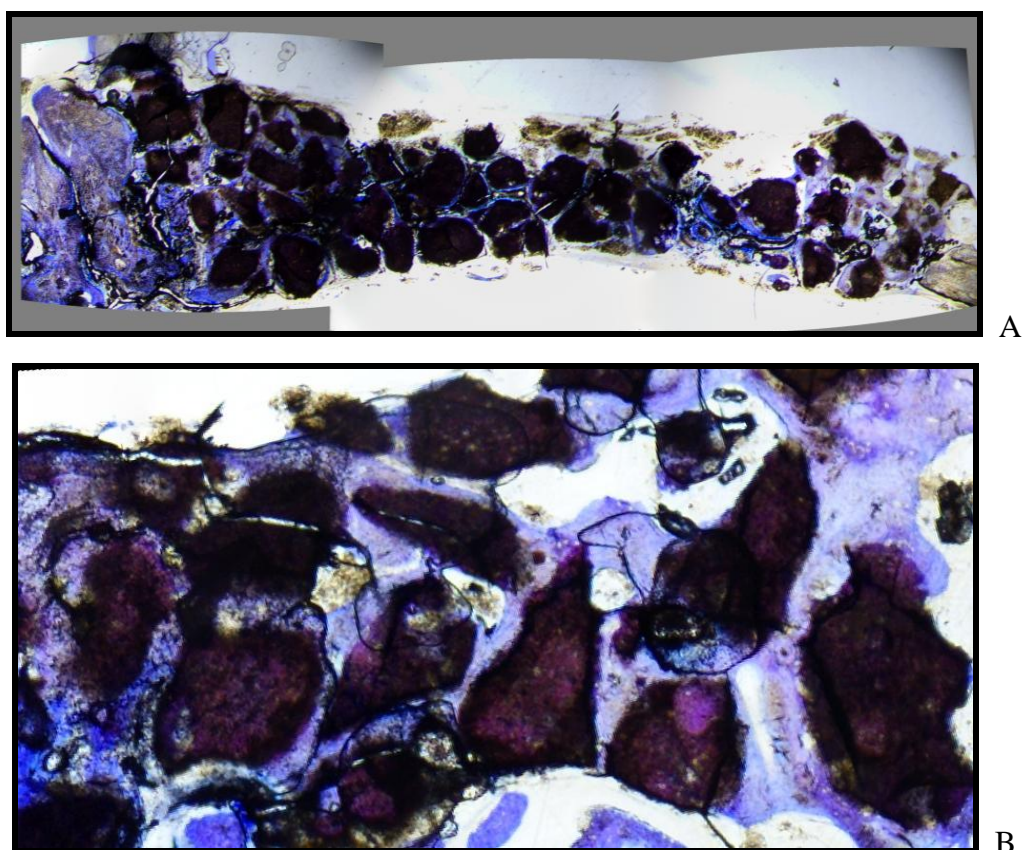


Figura 74 A y B: Corte histológico del 80% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 2X.

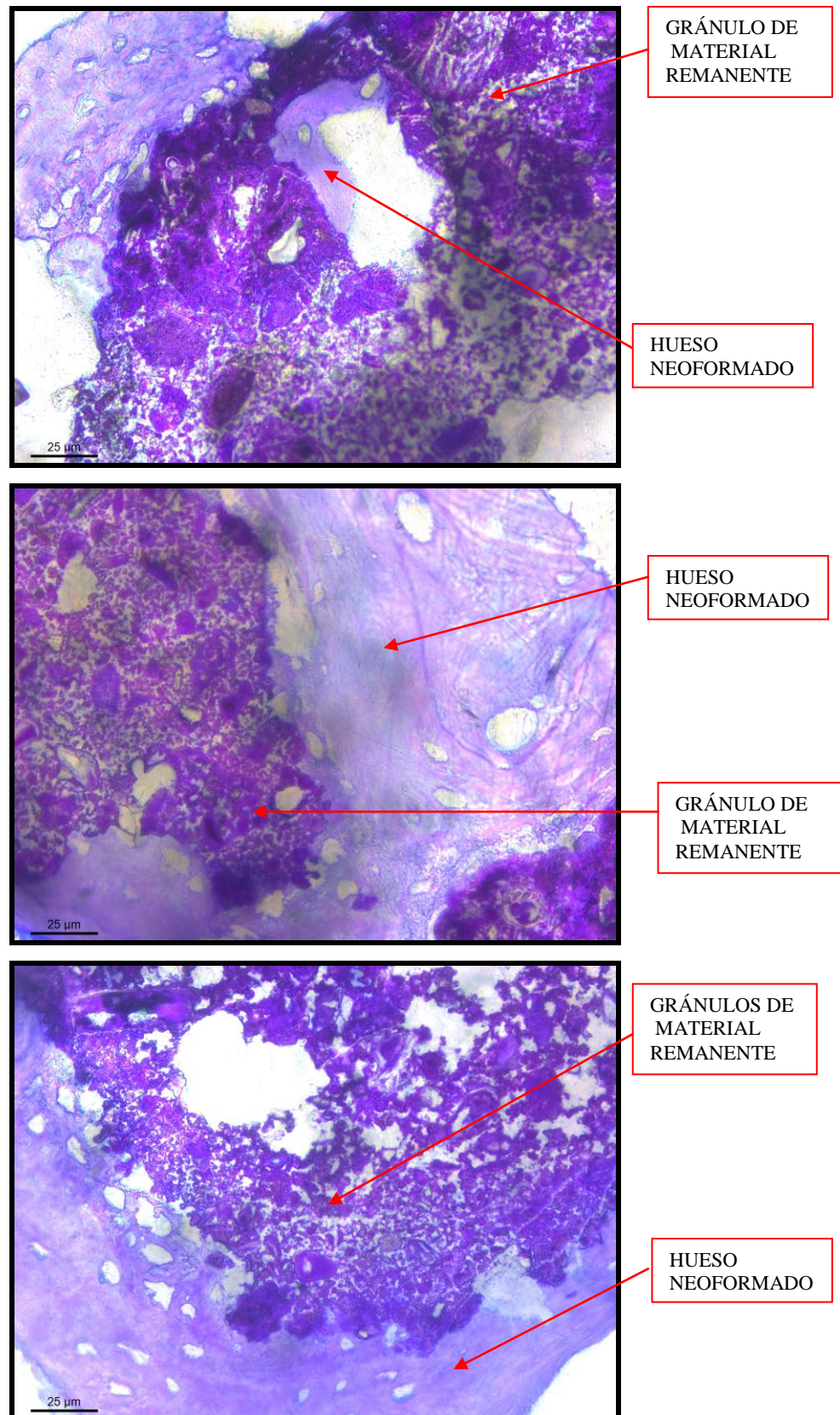


Figura 75: Corte histológico del 80% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 40X.

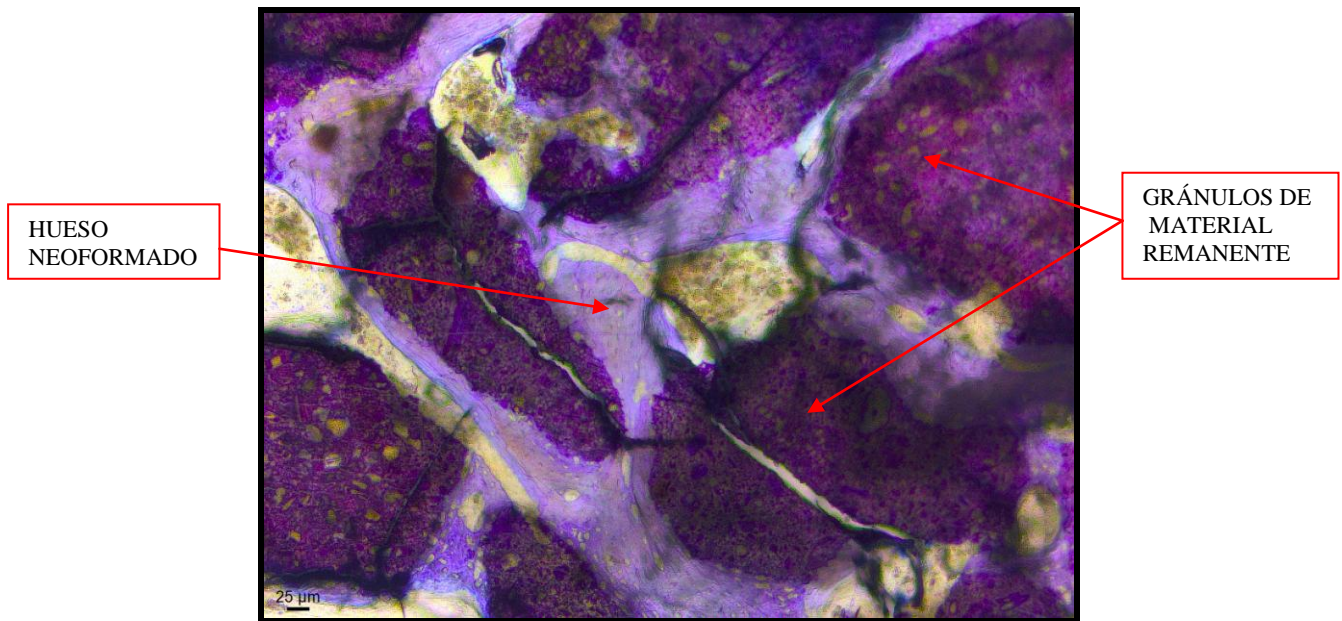


Figura 76: Corte histológico del 80% Si-CFC con tinción de azul de toluidina a las 8 semanas a 10X.

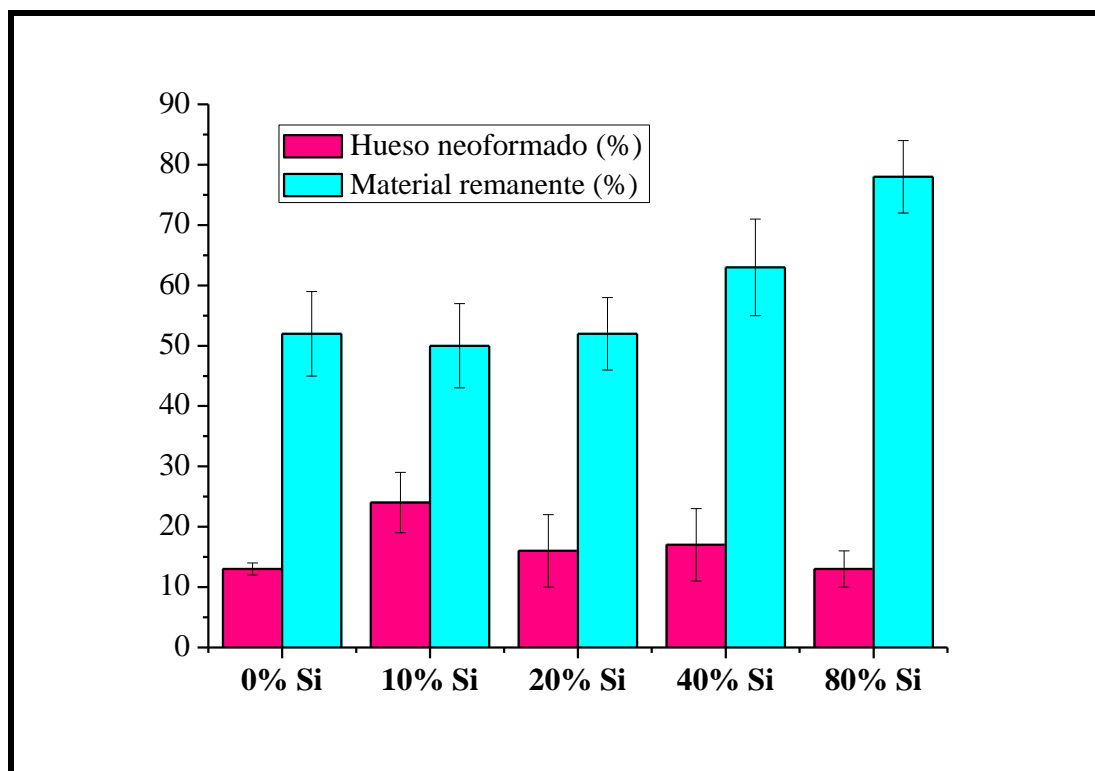


Figura 77: Gráfico con los porcentajes de hueso neoformado y material remanente, descritos en la tabla anterior, para los cementos preparados con 0% Si, 10% Si, 20% Si, 40% Si y 80% Si.

Tabla 24: Porcentaje de hueso neoformado y material remanente para CFC, 10% Si-CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC.

Material	Hueso Neoformado (%)	Material Remanente (%)
CFC	13 ± 1	52 ± 7
10% Si-CFC	24 ± 5	50 ± 7
20% Si-CFC	16 ± 6	52 ± 6
40% Si-CFC	17 ± 6	63 ± 8
80% Si-CFC	13 ± 3	78 ± 6

4.1.2 ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

La fracción de hueso neoformado y material remanente se analizó en cada imagen capturada con el microscopio óptico a una altura fija de 30 cm y a 2X de aumento. Para valorar cuantitativamente la cantidad de hueso formado, así como la de material remanente, empleamos el programa NIS Elements versión 3.00 con el que se procesaban las imágenes obtenidas con la cámara acoplada al microscopio óptico (Nikon Eclipse Ti). Se capturaron fotos de todo el defecto, y con el programa mencionado anteriormente, se calculó el área total de la superficie de hueso neoformado y de material remanente del injerto, medido en mm², y se analizaron como porcentajes del total del área (Tabla 24 y Figura 77).

El análisis estadístico ANOVA de un factor confirmó las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos materiales a las 8 semanas de experimentación. Para determinar entre que grupos de materiales existían dichas diferencias se empleó el Test de Tukey.

La cantidad de hueso neoformado en aquellos materiales sustituidos con 20, 40 y 80% de silicio, no obtuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al cemento de brushita sin dopar. Sin embargo, el cemento que contenía un 10% de silicio fue el que experimentó un mayor porcentaje de hueso, entre todos los materiales estudiados. Siendo la diferencia estadísticamente significativa cuando se comparaba con

Resultados y discusión: Estudio *in vivo* de regeneración ósea

el resto de materiales (CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC), como demuestran los datos de la Figura 78 A y la Tabla 25, expuestas a continuación.

Tabla 25: *Análisis estadístico ANOVA y test post hoc de Tukey, de los resultados de la cantidad de hueso neoformado en los diferentes cementos (CFC, 10% Si-CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC).*

ANOVA:

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Inter-grupos	627,70677	4	156,92669	6,02918	0,00154
Intra-grupos	650,6964	25	26,02786		
Total	1278,40318	29			

Test post hoc de Tuckey:

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
10% Si-CFC - CFC	13,61661	Si
20% Si-CFC - CFC	2,05453	No
20% Si-CFC - 10% Si-TCP	-11,56208	Si
40% Si-CFC - CFC	1,99163	No
40% Si-CFC - 10% Si-CFC	-11,62498	Si
40% Si-CFC - 20% Si-CFC	-0,0629	No
80% Si-CFC - CFC	-0,46688	No
80% Si-CFC - 10% Si-CFC	-14,08349	Si
80% Si-CFC - 20% Si-CFC	-2,52141	No
80% Si-CFC - 40% Si-CFC	-2,45851	No

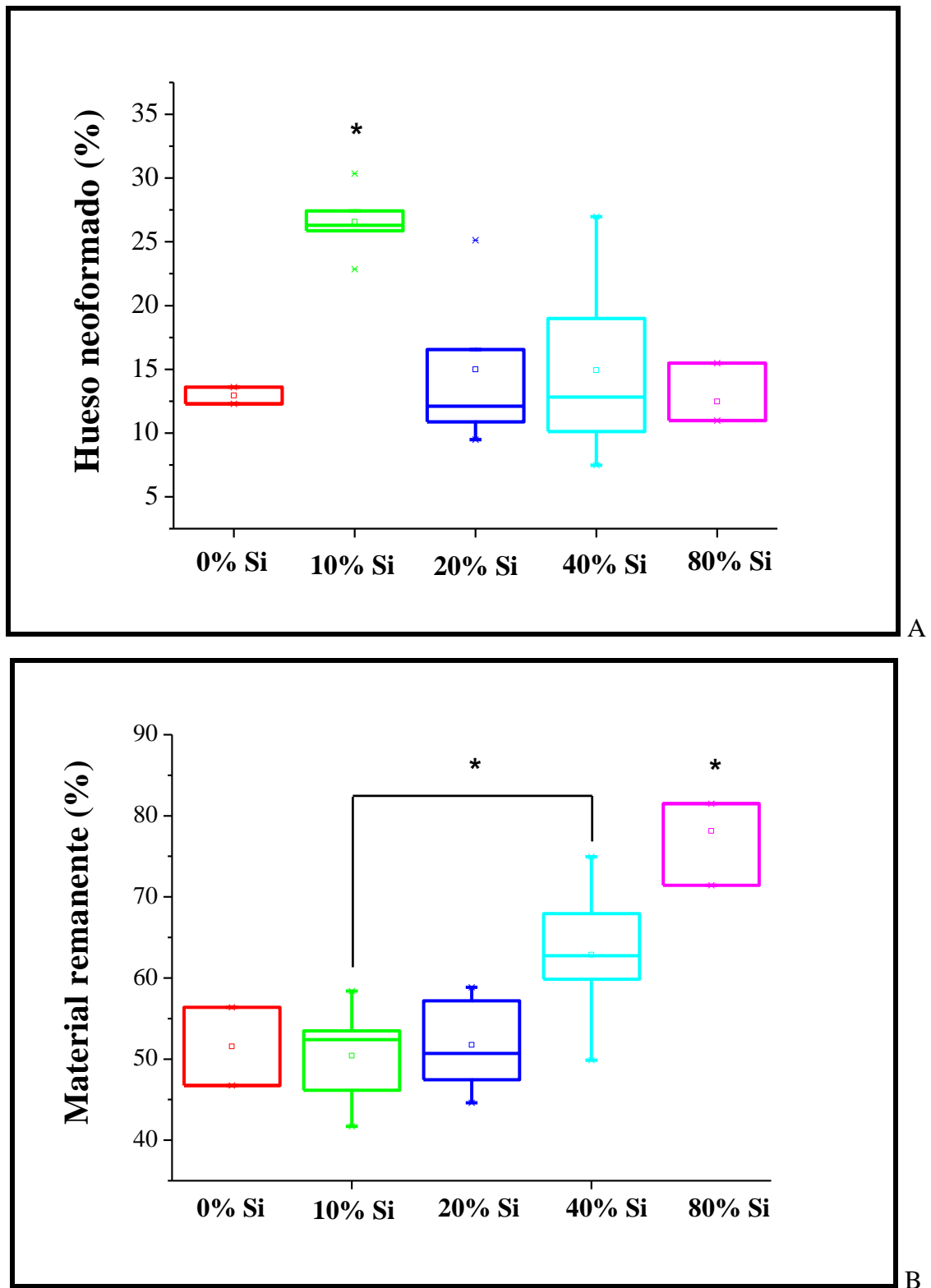


Figura 78: Gráfico del análisis estadístico ANOVA A: hueso neoformado y B: material remanente a las 8 semanas de experimentación en cada uno de los diferentes cementos (0%, 10% Si, 20% Si, 40% Si y 80% Si).

Resultados y discusión: Estudio *in vivo* de regeneración ósea

El porcentaje de material remanente creció considerablemente con los materiales sustituidos con un mayor porcentaje de silicio, especialmente con el de 80% de silicio. Las diferencias, entre el cemento preparado al 80% de Si, con respecto al resto de materiales, fueron estadísticamente significativas. También existieron diferencias estadísticamente significativas entre los materiales preparados al 10 y 40% de silicio, como demuestran los datos de la Figura 78 B y la Tabla 26, expuestas a continuación.

Tabla 26: Análisis estadístico ANOVA y test post hoc de Tukey, de los resultados de la cantidad de material remanente en los diferentes cementos (CFC, 10% Si-CFC, 20% Si-CFC, 40% Si-CFC y 80% Si-CFC).

ANOVA:

Fuente	Suma de los cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P<0.05
Inter-grupos	1990,05445	4	497,51361	9,60069	1,68027E-4
Intra-grupos	1036,41227	20	51,82061		
Total	3026,46672	24			

Test post hoc de Tuckey:

Grupos	Diferencia de medias	P<0.05
10% Si-CFC - CFC	-1,13983	No
20% Si-CFC - CFC	0,20105	No
20% Si-CFC - 10% Si-TCP	1,34087	No
40% Si-CFC - CFC	11,31877	No
40% Si-CFC - 10% Si-CFC	12,4586	Si
40% Si-CFC - 20% Si-CFC	11,11772	No
80% Si-CFC - CFC	26,58	Si
80% Si-CFC - 10% Si-CFC	27,71983	Si
80% Si-CFC - 20% Si-CFC	26,37895	Si
80% Si-CFC - 40% Si-CFC	15,26123	Si

4.2 DISCUSSION DEL ESTUDIO *IN VIVO* DE REGENERACIÓN ÓSEA

Los injertos de hueso autólogo son los mejores sustitutos óseos para la regeneración ósea, ya que son osteoconductores, osteoinductores y osteogénicos. Sin embargo, la disponibilidad de hueso autólogo puede estar comprometida, por ello necesitamos alternativas, como son los injertos sintéticos o aloplásticos, que son baratos y podemos obtener grandes cantidades, evitando la morbilidad al paciente de una cirugía adicional. La supremacía del β -TCP respecto a los sustitutos óseos de origen animal, en cuanto a neoformación ósea, ya ha sido descrita por distintos autores. Los fosfatos cálcicos han despertado el interés debido a su composición parecida a la del hueso natural. Algunos de los más utilizados son la HAP, el β -TCP y el DCPD. Existen numerosos estudios acerca de estos tres biomateriales, la HAP es la más biocompatible y la que tiene una menor reabsorción *in vivo*. Mientras que el β -TCP es considerado superior a los aloinjertos y xenoinjertos comúnmente utilizados, como el hueso desmineralizado y liofilizado (DFDB), además de ser más económico y el material sintético más adecuado para la osteoconducción, pero su reabsorción sigue siendo lenta *in vivo*, lo que dificulta su aplicación clínica. Sin embargo, el DCPD además de ser biocompatible y osteoconductor, se reabsorbe más rápido que el β -TCP permitiendo una formación de hueso más rápida ^[212]. Por tanto la mezcla de β -TCP y DCPD ^[213] podría aportar ventajas tanto en las propiedades mecánicas como en la regeneración ósea de los biomateriales.

Los cementos de brushita *in vivo* pueden transformarse a HAP a causa de la exposición a altas concentraciones de Ca^{2+} al entrar en contacto con los tejidos óseos ^[111, 214]. Cuando el contenido en brushita es alto, pueden producir la acidificación local por la descomposición de HAP y comprometer a la regeneración ósea. Por ello son necesarios estudios *in vitro* e *in vivo*, que demuestren la ausencia de reacciones inmunológicas o inflamatorias y que no se haya producido una intensa acidificación local. Después de los buenos resultados obtenidos en nuestro estudio *in vitro*, con los cementos dopados con silicio, se pasó al estudio *in vivo*, en el que también existió una perfecta interacción del material con el medio y ausencia de reacciones adversas. Se escogió el formato granulado y fraguado, porque aporta una mayor área superficial para interaccionar con el medio local, facilitando la difusión de los iones hacia el medio fisiológico ^[215].

Se optó por el conejo como animal de experimentación porque el hueso de su calota, que es donde se realizó la cirugía, presenta una relación adecuada de hueso cortical y trabecular ^[216]. Además la calota tiene el mismo origen embriológico que la región orofacial, por lo que las características del hueso son similares ^[217].

El sigma o periodo de remodelado óseo en los conejos es más rápido que en los humanos, unas 6 semanas aproximadamente, siendo este proceso tres veces más rápido que en los humanos ^[42, 218, 219, 220]. Decidimos esperar 8 semanas tras la intervención para el sacrificio de los animales ^[221, 222], ya que es el tiempo en el que se van a producir los cambios histológicos más relevantes en cuanto a la reparación del defecto y la formación de hueso nuevo. En tiempos de experimentación de 4 semanas o inferiores, sólo es posible valorar la biocompatibilidad del material, y tiempos superiores a 12 semanas, no nos aportan datos significativos en cuanto a neoformación ósea ^[223, 224]. Sin embargo también hay que tener en cuenta que la reabsorción completa del biomaterial necesitará periodos más largos ^[225].

El tamaño del defecto fue de 10 mm de diámetro y a espesor total, evitando dañar las meninges y la masa encefálica, como puede verse en la fotografía de la Figura 14 del apartado de material y método. Humber et al. ^[226] junto con otros autores proponen un defecto crítico de 15 mm de diámetro afirmando que este tamaño de defecto, sin injerto, no es capaz de regenerar por sí mismo ^[227, 228]. Otros estudios obtienen resultados similares con defectos de 8 ^[229] y 10 mm ^[230, 231, 226]. El corte histológico, de la Figura 63, en la que no se puso ningún tipo de biomaterial, corroboró que el defecto era lo suficientemente grande como para no poder regenerarse de forma espontánea ^[232, 233]. Así, obtuvimos un defecto crítico, con una cantidad mínima de tejido muscular y hueso medular como fuente potencial de células para su autorregeneración.

Existen referencias de reacciones inflamatorias leves que circundan los injertos y que podrían estar relacionadas con las complicaciones propias de la cirugía, la composición y formulación de los materiales empleados ^[234, 235]. En los animales utilizados en este trabajo no se han observado ningún tipo de reacción inflamatoria o tóxica.

En cuanto a la tinción empleada, el Azul de Toluidina presenta una buena coloración de las células del hueso, de manera superior a la hematoxilina-eosina ^[236]. De azul más intenso se tiñen los proteoglicanos (debido a la reacción metacromática con los mucopolisacáridos ácidos) y por tanto aparece de un color más intenso el hueso inmaduro ^[237].

En el estudio histológico pueden apreciarse diferencias en los cortes histológicos a medida que aumentábamos la concentración de silicio. Así el mayor porcentaje de hueso neoformado a las 8 semanas fue para aquellos cementos preparados al 10% de Si-TCP ($24 \pm 5\%$), y la menor formación de hueso para los materiales con el 80% Si-CFC ($13 \pm 1\%$) y CFC sin sustituir ($13 \pm 3\%$), como puede verse en la Tabla 24 y la Figura 77. El porcentaje de material remanente obtuvo los datos inversos, el porcentaje mayor fue para los materiales preparados al 80% Si-CFC ($78 \pm 6\%$) y el menor para los cementos con el 10% de Si-TCP ($50 \pm 7\%$). Analizando estos datos podemos concluir que aquellos materiales que obtuvieron una mayor reabsorción del material pudieron formar una mayor cantidad de hueso. Y que los materiales con menor reabsorción de material fueron los que presentaban un mayor porcentaje de silicio. Esto puede deberse a una posible transformación hacia HA de los cementos sustituidos a altas concentraciones de Si. Como ya hemos comentado anteriormente, la HA es uno de los fosfatos cálcicos que más tiempo tardan en reabsorberse ^[213]. Sin embargo en los materiales con bajo porcentaje de silicio (10% Si-CFC) podemos observar una reabsorción de los gránulos de cemento más rápida, la fase mayoritaria de estos cementos fue la brushita, que presenta un grado de reabsorción del material mucho más rápido.

En todos los cortes histológicos se aprecia perfectamente la buena interacción entre el hueso y el material, estableciéndose puentes óseos entre los gránulos del material en todos los biomateriales de este estudio. La presencia de áreas de reabsorción del material, dentro de los gránulos de cemento con hueso neoformado en su interior, indica que la formación ósea tiene lugar tras la reabsorción de los gránulos. Los osteoblastos formarán una línea en la interfase del hueso y el gránulo de cemento de brushita, depositando matriz ósea no mineralizada, que a posteriori se mineraliza, formando hueso trabeculado inmaduro o reticular, en contacto directo con la superficie de los gránulos de cemento no reabsorbidos. Por lo que el hueso localizado cerca de la

superficie de los gránulos es menos maduro que el hueso que está más lejos. El hueso reticular está formado por fibras de baja fuerza que se ordenan rápidamente durante el crecimiento o la reparación ósea, este posteriormente será reemplazado por el hueso laminar, mucho más fuerte porque se forma mediante fibras paralelas. El hueso neoformado rodea los osteoblastos induciendo su transformación a osteocitos ^[216, 237].

El comportamiento *in vivo* de las cerámicas de fosfato cálcico sustituidas por silicio como la HA ^[21, 238], el α -TCP ^[22, 24] y, en un estudio más reciente realizado por Manchón, el β -TCP ^[23], han obtenido excelentes resultados en cuanto a regeneración ósea. En el trabajo de Manchón, las cerámicas al 10% Si- β -TCP consiguieron un 50% de neoformación ósea a las 12 semanas de experimentación y de un 73% para el 80% Si- β -TCP. Estos materiales tenían un diámetro medio de poro de 13,29 μm y 2,85 μm para las cerámicas al 10% Si- β -TCP y 80% Si- β -TCP, respectivamente, mayor que en nuestros materiales, lo que podría ayudar a una reabsorción más rápida del material ^[176], y por tanto a una mayor formación de hueso. Xu et al. ^[153] también obtuvieron buenos resultados, en cuanto a formación ósea, al emplear una cerámica porosa de silicato cálcico, con una mayor reabsorción *in vivo*, respecto a una cerámica de β -TCP sin sustituir. La reabsorción del cemento ocurre mediante la disolución del cemento en el líquido extracelular, la desintegración y la formación de partículas, algunos artículos sugieren que en la degradación del cemento *in vivo* colaboran también macrófagos, células gigantes y osteoclastos, que fagocitan las partículas del cemento ^[112, 114]. Por tanto, los tiempos de reabsorción deben ser adecuados para que las células tengan la capacidad para fabricar su propia estructura alrededor del material, siendo este el andamio capaz de proporcionar la integridad estructural necesaria en el lugar injertado. La matriz extracelular actúa de forma pasiva, a modo de red, para que las células del hueso puedan mantenerse dentro de dicha matriz y se unan a distintos componentes, como citoquinas mediante las integrinas y otros receptores de membrana para influir de forma directa o indirecta en el crecimiento, migración, diferenciación y adhesión celular ^[16].

Para realizar el estudio histomorfométrico se calculó el área total de la superficie de hueso neoformado del injerto medido en mm^2 , así como la de material remanente. Y se analizaron como porcentajes del total del área. El porcentaje de hueso neoformado fue similar con los cementos dopados al 80% de Si, respecto al cemento sin dopar.

Mientras que los cementos dopados al 10, 20 y 40 % de silicio obtuvieron un mayor porcentaje de formación de hueso que los cementos sin silicio. El único material que obtuvo diferencias estadísticamente significativas, de hueso neoformado, fue el cemento al 10% de silicio, respecto al resto de materiales (CFC, 20, 40 y 80 % Si-CFC), según los resultados del test de Tukey que se muestra en el gráfico de la Figura 78 A y la Tabla 25.

En cuanto al porcentaje de material remanente, el 80% de silicio fue el que obtuvo una mayor cantidad de cemento sin reabsorber, siendo este valor estadísticamente significativo respecto al resto de materiales (CFC, 10, 20 y 40% Si-CFC). También se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los el 10 y el 40% de Si-CFC. Según los resultados de la Tabla 26 y el gráfico de la Figura 78 B. Estos datos coinciden con los presentados por Alkhraisat et al. ^[4] que obtuvieron una formación de hueso similar, después de 8 semanas, en aquellos cementos de brushita modificados con gel de sílice respecto a los que no lo estaban, la cantidad de injerto sin reabsorber fue superior en aquellos injertos modificados. Esto se atribuyó al alto contenido en TCP en estos cementos de brushita, que poseen una reabsorción mucho más lenta que la brushita.

Hemos logrado sintetizar un biomaterial con el que podemos regular el grado de reabsorción en función de la concentración de silicio. Los materiales que presentaron mejores propiedades para la regeneración ósea fueron los cementos dopados al 10% de silicio, ya que son los que obtuvieron un mayor porcentaje de hueso neoformado con diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de materiales.

IX.- DISCUSIÓN FINAL

Los cementos de fosfato cálcico son una gran alternativa como sustitutos óseos como hemos ido viendo a lo largo de este trabajo. Presentan ventajas respecto a los injertos de hueso autólogo, ya que se evita una segunda cirugía al paciente y se puede disponer de una cantidad ilimitada. También mejora las propiedades de otro tipo de injertos sintéticos, como son las cerámicas, debido a su capacidad de ser moldeable, inyectable y fraguar *in vivo* dentro de la cavidad oral.

La sustitución iónica juega un papel importante en la bioquímica de la apatita ósea, que tiene una estructura cristalográfica similar a la hidroxiapatita. En los cristales de apatita ósea se han incluido varias sustituciones aniónicas y catiónicas que dan lugar a cristales microscópicos ^[194, 239]. Siendo lo suficientemente insolubles para asegurar su estabilidad, y lo suficientemente reactivos para permitir el proceso de remodelado óseo, en la reabsorción y re-precipitación *in vivo* ^[240]. La sustitución iónica con silicio es interesante en los cementos de fosfato cálcico, debido a que el silicio juega un importante papel durante los estadios iniciales de la formación del hueso en los procesos de calcificación, y es uno de los elementos esenciales en el desarrollo de células osteoblásticas ^[7, 18, 119, 124].

El sintetizado de DCPD y carbonato cálcico a 1100° C produce de forma satisfactoria una cerámica bifásica compuesta de fosfato tricálcico- β y silicocarnotita. Al mezclar esta cerámica y MCPM, con otra fase líquida de ácido cítrico al 1M, obtuvimos una pasta de cemento que fraguaba a temperatura ambiente. El análisis de los patrones de difracción de rayos X de los cementos dopados con silicio muestra, que la matriz de estos cementos se compone de elementos cristalinos y otros amorfos. La fase predominante en los cementos preparados con un contenido de Si \leq 40% fue la brushita. El desplazamiento de los picos hacía ángulos de difracción menores, junto con el aumento en el volumen de la celdilla y la presencia de iones de silicio en cristales cuya relación Ca/[P+Si] es en torno a 1, nos sugieren la inclusión de iones de silicio en los cristales de brushita. También se identificó en los cementos dopados con silicio la presencia de HA, que al aumentar el contenido de silicio, aumentaba la intensidad de sus picos de difracción. Damen et al. ^[165] ya sugirieron que los iones de silicio podían favorecer la precipitación de HA antes que la de brushita. Otras de las fases detectadas han sido la silicarnotita, el β -TCP sin reaccionar y la monetita. Además, la presencia de un halo centrado en 2θ cerca de 30°, puede indicar la presencia de una fase de silicato

Discusión final

cálcico hidratado (C-S-H) en aquellos cementos preparados con Si-TCP con un contenido de Si $\geq 20\%$. La composición de los cementos dopados con Si se corroboró mediante el análisis FTIR, con el que se determinó la presencia de HA y de C-S-H.

La reducción del tiempo de fraguado final al aumentar el contenido en silicio nos obligó a ir disminuyendo su relación polvo/líquido. La presencia de silicato cálcico hidratado (C-S-H) podría servir como núcleo para la precipitación de brushita y fases de HA, contribuyendo a acortar el tiempo de fraguado del cemento ^[167, 168]. La fuerza de tensión diametral de los cementos dopados al 10 y 40% de silicio obtuvieron unos resultados superiores, cuando se les comparaba con el cemento sin dopar, sin embargo estos valores disminuían a grandes concentraciones de silicio, debido a la disminución de la relación polvo/líquido y al cambio morfológico de sus cristales hacía formas más redondeadas, como puede apreciarse en el análisis de SEM, que impiden el entrecruzamiento de los cristales. Al incorporar el silicio, la morfología de los cristales del cemento iba cambiando gradualmente de un predominio de cristales de forma de placa, hacia cristales con forma redondeada y con un diámetro menor, aproximadamente 160 nm. Curiosamente, también se distinguieron estructuras tridimensionales, en la matriz de cemento preparado con 60% y el 80% de Si-TCP, que podría estar relacionado con el auto-ensamblaje de estos cristales nanométricos.

Estos cambios morfológicos mejoraron el área de superficie específica (SSA) de los cemento dopados con silicio. Aunque el SSA fue menor para los cementos preparados con 10 y 20% Si-TCP, el área específica se fue incrementando según aumentaba el porcentaje de silicio, que podría estar relacionado con la reducción en el tamaño de los cristales y con la precipitación de HA y C-S-H, cuyas áreas específicas son mayores que los cristales de brushita ^[168, 180].

La porosidad y el tamaño de los poros juegan un papel fundamental en los biomateriales, ya que permiten la migración y proliferación de los osteoblastos y las células mesenquimales, así como la vascularización necesaria en el mantenimiento del tejido óseo neoformado y su posterior remodelación. Aunque la porosidad de los cementos preparados con Si-TCP se mantuvo entorno al 40% aproximadamente, la distribución del tamaño medio de poro se desplazó a un rango nanométrico (20 nm), debido a la disminución del tamaño de los cristales y la adquisición de una morfología

Discusión final

redondeada, mejorando ambas propiedades el empaquetamiento de los cristales. La porosidad aumenta el área de superficie y con ello la interacción entre el material y el hueso. La microporosidad, o aquellos poros con un tamaño $< 10 \mu\text{m}$ junto con la interconexión de los poros, son esenciales para proporcionar una mayor área de superficie, que favorezca la adsorción de proteínas; así como el intercambio de iones, la solubilidad iónica y la formación de apatita ósea, mediante procesos de disolución y reprecipitación. Es importante tener en cuenta que tanto el aumento de la porosidad como del tamaño del poro reducirán las propiedades mecánicas del material ^[176].

Estos cambios estructurales inducidos por iones de Si, nos proporcionan una herramienta para controlar el uso de los cementos, como un sistema de administración de medicamentos. Se eligió la vancomicina como antibiótico, ya que está implicada en la profilaxis de infecciones nosocomiales de hueso por *Staphylococcus Aureus*, y no muestra ninguna interacción fuerte con la matriz de fosfato de calcio ^[194].

El estudio de la adsorción de vancomicina en los cementos, muestra que la cantidad de droga adsorbida aumenta, con el aumento en la concentración de vancomicina en el medio de incubación. Esto coincide con estudios anteriores, que muestran que la cantidad adsorbida de la droga, dependerá de su concentración en el líquido que penetraría por los poros y huecos del cemento ^[180]. Aquellos cementos dopados con silicio, muestran una eficacia significativamente mayor a la hora de captar el antibiótico del medio de incubación. Esta efectividad se relaciona con el aumento del área específica de los cementos dopados, aumentando así el número de sitios de disponibles para unirse con el antibiótico. Por otro lado, los cambios estructurales (precipitación de HA y C-S-H) podrían también mejorar a captar el antibiótico, ya que se ha demostrado en artículos previos que la HA obtiene mejores resultados que la brushita al adsorber la vancomicina ^[165].

Los cementos de fosfato cálcico poseen además la capacidad de introducir el medicamento a través de todo el volumen del material, incorporando la droga en una de sus dos fases, por lo que tendríamos de otro sistema para la incluir el fármaco. Éste método facilita una liberación del fármaco más prolongada en el tiempo. El sintetizado de las cerámicas a altas temperaturas provocaría la descomposición del fármaco, a diferencia de los cementos que ocurre a temperatura ambiente. Al incorporar el

antibiótico en la fase sólida de los cementos, aumentó el tiempo de fraguado y se redujeron las propiedades mecánicas de los cementos.

La sustitución con Si afectó significativamente el perfil de liberación de la droga y el mecanismo que lo controla, tanto con el método de incorporación mediante adsorción, como cuando lo introducíamos en su fase sólida. El perfil típico de liberación de drogas de los cementos de brushita, está compuesto por una liberación inicial rápida, que disminuye su velocidad y se estabiliza hasta adquirir una forma constante con el paso del tiempo ^[180, 199]. Aunque el perfil de la liberación de vancomicina del cemento preparado con 40% Si-TCP, es similar al del cemento de brushita, este perfil es casi lineal y con una velocidad constante, para el cemento preparado con 80% Si-TCP, cambiando la cinética de liberación del fármaco de primer orden a una de orden cero. La velocidad de liberación del medicamento fue más lenta, para los cementos preparados con 40% y 80% Si-TCP, que el cemento de brushita sin sustituir. Cuanto mayor era la cantidad de vancomicina adsorbida en los cementos, mayores eran la velocidad de la liberación y el total de fármaco liberado.

El mecanismo de liberación de la droga se obtuvo mediante el cálculo del modelo de Peppas, que fue de difusión para la mayor parte de los cementos a los que se les incorporó la droga mediante la adsorción y aquellos cementos a los que se les incorporó bajas dosis de vancomicina en su fase sólida. En cambio para los cementos con altas dosis de vancomicina en su fase sólida, el transporte anómalo fue el mecanismo de liberación mayoritario. Estos cambios en el perfil de la liberación del medicamento, podrían estar relacionados con la porosidad y la composición del cemento. Aunque los cementos dopados con silicio, tienen una porosidad comparable a los cementos de brushita no dopados, el porcentaje de liberación más lento en los cementos sustituidos con Si, puede estar relacionado con un diámetro de poro menor junto con su amplia distribución. Lo que atribuye una mayor tortuosidad a la matriz de cemento, siendo un factor de control de la difusión. Tanto el diámetro de poro como el área de superficie del cemento podrían estar relacionados con los valores K y n de la ecuación $M=kt^n$ del modelo de Peppas. Podemos observar que un aumento en el área de superficie y un descenso del diámetro de poro producían un descenso en la constante K y del exponente n , y por tanto esto afectará tanto a la velocidad como a la cinética de liberación. También podría verse influenciado por la composición estructural de la

Discusión final

matriz de cemento, que muestra principalmente la presencia de brushita, C-S-H y HA. La HA ya ha mostrado en estudios anteriores, una liberación más lenta de la vancomicina que la brushita, o la monetita ^[180]. Los nuevos cementos nos proporcionan por tanto una herramienta eficaz para controlar tanto el porcentaje de liberación de fármaco, en relación a la dosis cargada, como para seleccionar la cinética de liberación, de orden cero o de primer orden, en función del porcentaje de silicio.

La liberación de iones de los cementos, se acompañó de cambios en el pH de los medios de incubación (agua bidestilada). Para los cementos sin sustituir, el pH fue ácido (pH=3,7) durante los primeros días de incubación. Mientras que para los cementos dopados con silicio al 40 y 80 % el pH fue ligeramente básico, todos los materiales se estabilizaban a un pH neutro de aproximadamente 7, al cuarto día de incubación. El pH ideal para los cultivos celulares está en torno a los 7,2-7,4 ^[241], por lo que nuestros cementos se encontrarían en un rango óptimo. Así lo demuestra el test de citocompatibilidad con células osteoblásticas MG-63.

Estos cambios en el pH podrían ilustrar los cambios en la liberación de iones de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y SiO_4^{4-} , que tienen también un efecto importante sobre las células. Los cementos no dopados experimentaron una liberación brusca de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , los primeros días de la incubación. Mientras que en los cementos dopados la liberación de iones de Ca^{2+} , fue constante, y la de PO_4^{3-} decrecía a medida que aumentaba la concentración de silicio. La liberación de iones de silicio aumentaba conforme aumentaba la concentración de silicio. El cemento preparado con 80% Si-TCP obtuvo valores muy superiores en la proliferación y la actividad celular con respecto a los cementos no dopados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, esto podría estar provocado por la liberación de iones de silicio. Diferentes estudios han demostrado resultados similares, de los iones de SiO_4^{4-} sobre las células osteoblásticas, utilizando el ácido ortosilícico, productos de degradación de los materiales que contienen Si (biovidrio, silicato dicálcico), o mediante la siembra directa de células sobre cerámicas sustituidas con silicio ^[20, 23, 132, 133, 134, 135, 136, 189]. El aumento en la proliferación y la actividad de las células osteoblásticas, podría estar mediado por el aumento en la producción de los factores de crecimiento y la actividad de los genes, que son necesarios para la proliferación osteoblástica, la remodelación de la matriz extracelular y la adhesión matriz-célula. Diferentes estudios han valorado el aumento en el factor de

Discusión final

crecimiento transformante- β (TGF- β), la proteína ósea morfogénica 2 (BMP-2), la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), y la codificación de genes para la osteocalcina, ALP, BMP-2 y Smad1^[133, 134]. Además, se ha demostrado que sílice soluble desempeña un papel esencial en el entrecruzamiento de colágeno y proteoglicanos durante el crecimiento óseo^[124].

Los cementos dopados con silicio mejoraron el crecimiento y la proliferación de las células osteoblásticas, lo que supuso una indicación para seguir estudiando su eficacia para las técnicas de regeneración ósea. La regeneración ósea dependió del grado de reabsorción del material, así los materiales dopados al 10% de silicio son los que presentaron una mayor capacidad de regeneración ósea, encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de materiales. A medida que aumentábamos el porcentaje de silicio dentro de los cementos, la cantidad de material remanente era mayor. Los cementos dopados al 80% de Si mantuvieron casi el 80% del material sin reabsorber a las 8 semanas de la cirugía. Esto podría deberse a que los cementos dopados con altos porcentajes de silicio podrían sufrir una transformación a hidroxiapatita, que tiene la propiedad de reabsorberse de forma más lenta que la brushita^[213]. La interacción del material con el medio fue buena en todos los materiales, y en todos ellos a medida que se reabsorbía el material se formaba hueso nuevo entorno a los gránulos de cemento remanente. Por lo que hemos logrado sintetizar un biomaterial con el que podemos regular el grado de reabsorción de este en función de la concentración de silicio. Los materiales que presentaron unas mejores propiedades para la regeneración ósea fueron los cementos dopados al 10% de silicio, ya que son los que obtuvieron un mayor porcentaje de hueso neoformado.

Los cementos de brushita dopados con silicio han demostrado poseer propiedades novedosas respecto a otros cementos de brushita. Hemos logrado obtener matrices nanoporosas y con una gran área específica, en función del porcentaje de silicio, lo cual ha contribuido a lograr una velocidad de liberación de antibiótico constante, con una cinética de orden cero, para los cementos dopados al 80% de Si. Además los cementos dopados a grandes concentraciones de silicio obtuvieron una proliferación y actividad celular muy superior al resto de materiales. Sin embargo en el estudio *in vivo*, los cementos dopados al 10% de silicio son los que presentaron un mayor porcentaje de hueso neoformado, respecto al resto de cementos, siendo esta

Discusión final

diferencia estadísticamente significativa, por lo que estos cementos son los que presentaron mejores propiedades para la regeneración ósea. Estos resultados son altamente innovadores, ya que la sustitución de grupos fosfato por grupos silicato en los cementos de brushita mejoraron las propiedades del material en función del porcentaje de silicio, obteniendo así un resultado más eficaz en regeneración ósea o en la liberación de fármacos.

X.- CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El silicio se incorporó de forma eficaz en los cristales del cemento de brushita, obteniendo como resultado la formación de C-S-H e HA en los cementos con mayor concentración de Si. Las propiedades mecánicas tenían una tendencia general a disminuir cuanto mayor era la concentración de silicio de los cementos dopados; sin embargo, el área de superficie aumento notablemente conforme se incrementaba la concentración de silicio, cambiando el diámetro de los poros a un rango nanométrico.
2. Los cementos dopados con silicio proporcionaron un soporte adecuado para la proliferación y actividad celular *in vitro*. No se observó citotoxicidad en ningún material.
3. Los nuevos cementos nos proporcionaron una herramienta eficaz para controlar tanto el porcentaje de liberación de fármaco, en relación a la dosis cargada; como para seleccionar la cinética de liberación, de orden cero o de primer orden, en función del porcentaje de silicio.
4. Los resultados de la regeneración ósea *in vivo* mostraron una formación de hueso superior, respecto a los cementos sin dopar, con los cementos preparados al 10, 20 y 40% de Si, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con el 10% Si-CFC. La cantidad de material remanente fue mayor en aquellos materiales con mayor concentración de silicio. El biomaterial se integró perfectamente en todos los casos no produciéndose ninguna reacción adversa.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

- 1 Seidi A, Ramalingam M, Elloumi-Hannachi I, Ostrovidov S, Khademhosseini A. Gradient biomaterials for soft-to-hard interface tissue engineering. *Acta Biomater* 2011;7:1441-1451.
- 2 Seidi A, Ramalingam M. Engineering of Gradient Biomaterials as Biomimetic Systems for Tissue Engineering. *J Biomater Tissue Eng* 2011;1:139-148.
- 3 Alkhraisat MH, Rueda C, Cabrejos-Azama J, Lucas-Aparicio J, Marino FT, Torres Garcia-Denche J, et al. Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement. *Acta Biomater* 2010;6:1522-1528.
- 4 Alkhraisat MH, Rueda C, Jerez LB, Tamimi FM, Torres J, Gbureck U, et al. Effect of silica gel on the cohesion, properties and biological performance of brushite cement. *Acta Biomater* 2010;6:257-265.
- 5 Alkhraisat MH, Moseke C, Blanco L, Barralet JE, Lopez-Cabarcos E, Gbureck U. Strontium modified biocements with zero order release kinetics. *Biomaterials* 2008;29:4691-4697.
- 6 Tamimi F, Torres J, Gbureck U, Lopez-Cabarcos E, Bassett DC, Alkhraisat MH, et al. Craniofacial vertical bone augmentation: a comparison between 3D printed monolithic monetite blocks and autologous onlay grafts in the rabbit. *Biomaterials* 2009;30:6318-6326.
- 7 Carlise E. The nutritional essentiality of silicon. *Nutr Rev* 1982; 40:193-121
- 8 Organización Mundial de la Salud [Internet]. Madrid: 2013 [Consulta 3 Mayo de 2013]. Disponible a: <http://www.who.int/topics/ageing/es/>.
- 9 Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Madrid: 2010 [Consulta el 3 de Mayo de 2013]. Disponible a: <http://www.ine.es>.
- 10 Barrère F, Mahmood T A, Groot K, van Blitterswijk. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering*. 2008; R 59: 38-71.
- 11 Vallet Regí M. Cerámicas. En: María Vallet Regí, Luis Munuera editores. *Biomateriales: aquí y ahora*. 1ª ed. Madrid: Dykinson; 2000. p. 69-74.
- 12 Vallet Regí M. Sustitutivos y cementos. En: María Vallet Regí, Luis Munuera editores. *Biomateriales: aquí y ahora*. 1ª ed. Madrid: Dykinson; 2000. p. 75-83.
- 13 Ginebra Molins MP. IV. Liberación de fármacos a partir de cementos de fosfato cálcico. En: María Vallet Regí, Antonio Luis Doadrino Villarejo editors. *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas*. 1ª ed. Madrid: Fundación Casares Gil; 2006. p. 111- 140.
- 14 Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. *J Dental Res* 1983;62:672..

- 15 Lemaitre J, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels* 1987;10:141–6.
- 16 Alkhraisat MH. Bioactividad de cementos de fosfatos cálcicos sustituidos con estroncio y su aplicación en regeneración ósea [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2008.
- 17 Cabrejos Azama J. Modificación de cementos de fosfatos cálcicos con fosfatos de magnesio para la regeneración de defectos óseos [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de odontología Universidad Complutense de Madrid; 2012.
- 18 Carlisle E M. Si: a possible factor in bone calcification. *Science* 1970; 167: 279-80.
- 19 Yamada Mo, Thono S, Utsumi M, Moriwake Y, Yamada G. Silicon compatible with the height of human vertebral column. *Biol Trace Elem Res* 2003; 95:113-121.
- 20 Reid JW, Pietak A, Sayer M, Dunfield D, Smith TJN. Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials* 2005; 26:2887-2897.
- 21 Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27:5014-5026.
- 22 Camiré CL, Saint-Jean SJ, Mochales C, Nevsten P, Wang JS, Lidgren L, McCarthy I, Ginebra MP. Material characteritacion and in vivo behavior of silicon substituted alpha-tricalcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76:424-431.
- 23 Manchón Miralles A. Síntesis y caracterización de cerámicas de fosfato cálcico sustituidas con iones de estroncio, silicio y hierro [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Rey Juan Carlos I; 2011.
- 24 Pietak Am, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2007; 28:4023-4032.
- 25 Patel N, Best S, Bonfield W, Gibson I, Hing K, Damien E, et al. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Med* 2002; 13:1199-1206.
- 26 Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera García MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E47-51.
- 27 Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976; 47:327-55.
- 28 Anitua Aldecoa E. Un Nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF).1ª ed. Vitoria: Puesta al día publicaciones, sl.; 2000.

- 29 Gayoso Rodriguez M, Iñiguez Lobeto C, Al-Majdalawi Mohammad A, Díaz-Flores Feo L. Histología general. En: Antonio Bascones Martínez editores. Tratado de odontología Tomo I. 1ª ed. Madrid: Smithkline Beecham, SA; 1999. p. 333-351.
- 30 Frydman J. Ortodoncia en adultos, fundamentos biológicos e histológicos. En: Harfin JF editor. Tratado ortodóntico en el adulto. 2ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana; 2006. p. 1-12.
- 31 Gartner LP, Hiatt JL. Atlas color de histología. 4ª ed. Madrid: Médica panamericana; 2006.
- 32 Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera García MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11: E151-7.
- 33 Misch CE, Misch-Dietsh F. Capítulo 36: Claves para los injertos óseos y los materiales de injerto óseo. En: Carl E. Misch editor. Implantología contemporánea. 3ª ed. Barcelona: Elsevier-Mosby; 2009. p. 839-869.
- 34 Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M. Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia génica en cirugía ortopédica y traumatología. Mapfre medicina 2003; 14 (1): 51-65.
- 35 Guyton AC. Tratado de fisiología médica. 7ª ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill; 1989.
- 36 Cartillo Garzón MJ. Metabolismo fosforo-cálcio y fisiología mineral del hueso y diente. En: Antonio Bascones Martínez editores. Tratado de odontología Tomo I. 1ª ed. Madrid: Smithkline Beecham, SA; 1999. p. 467-472.
- 37 Roberts WE. Capítulo 26: Fisiología, metabolismo y biomecánica óseos. En: Carl E. Misch editor. Implantología contemporánea. 3ª ed. Barcelona: Elsevier-Mosby; 2009. p. 557-598.
- 38 Soleri JJ. El tejido óseo en implantodoncia (I). Rev Esp Odont Implant 1995; 3(1): 3-10.
- 39 Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. Curr Op Orthop 2000; 11: 403-412.
- 40 Parfitt MA. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. Bone 2002; 30(1): 5-7.
- 41 Roberts WE, Garetto LP, Brezniak N. Capítulo 16: Fisiología y metabolism óseo. En: Carl E. Misch editor. Implantología contemporánea. 1ª ed. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1995. p. 324-350.
- 42 Cornell CN. Regeneration of bone in critical defects. J Orthop Trauma 1999; 13: 523-4.

- 43 Burwell RG. Osteogenesis in cancellous bone graft: Considered in terms of cellular changes, basic mechanisms and the perspective of growth control and its possible aberrations. *Clin Orthop* 1965;40:35-40.
- 44 Ueng SW, Lin SS, Wang CR, Liu SJ, Tai CL, Shih CH. Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: study of bone mineral density and torsional strength of rabbits. *J Trauma* 1999;46(1): 110-115.
- 45 Riancho JA, Gutierrez GE. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. *Revista metabolismo óseo y mineral* 2003; 1(2): 51-66.
- 46 Adriaens PA. Preservation of bone sites. En: Lang NP, Karring T, Lindhe J (eds). *Proceeding of the 3rd European workshop on periodontology. Implant dentistry*. Berlin: Quintessence, 1999: 266-280.
- 47 Mish CE, Resnik RR. Capítulo 20: Evaluación médica del paciente implantológico. En: Carl E. Misch editor. *Implantología contemporánea*. 3^a ed. Barcelona: Elsevier-Mosby; 2009. p. 421-466.
- 48 Botticelli D, Berglundh T, Persson LG, Lindhe J. Bone regeneration implants with turned or rough surfaces in self-contained defects. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 448-455.
- 49 Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J. Hard tissue alterations following immediate implants placement in extractions sites. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 820-828.
- 50 Araujo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 212-218.
- 51 Irinakis T, Tabesh M. Preserving the socket dimensions with bone grafting in single sites: an esthetic surgical approach when planning delayed implant placement. *J Clin Periodontol*. 2007; 33(3): 156-163.
- 52 Blanco J, Nuñez V, Aracil L, Muñoz F, Ramos I. Ridge alterations following immediate implant placement in the dog: flap versus flapless surgery. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 640-648.
- 53 Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br*. 1963;45:402
- 54 Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extractions sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 809-818.
- 55 Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*. 2000; 26 (1): 1-6.
- 56 Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration—communication of cells. *Clin Oral Impl Res*. 2012; 23(10): 1127–1135.
- 57 Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990; 2: 237-43.

- 58 Schmitz J, Hollinger J. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonjunction. *Clin Orthoped Relat Res* 1986; 205: 299-304.
- 59 Farzad M, Mohammadi M. Guided bone regeneration: A literature review. *J Oral Health Oral Epidemiol*. 2012; 1(1): 3-18.
- 60 Hitti RA, Kerns DG. Guided Bone Regeneration in the Oral Cavity: A Review. *The Open Pathology Journal*. 2011, 5, 33-45.
- 61 Caroli GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in bone large defects: any specific needs? *Injury, Int J Care Injured*. 2011; 42: S56-S63.
- 62 Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone Graft Mateirlas and Synthethic substitutes. *Radiol Clin N Am*. 2006; 44: 451-461.
- 63 Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM. Bone-graft substitutes: facts, fictions and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001; 83-A:98-103.
- 64 Zárate-Kalfópulos B, Reyes-Sánchez A. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Cirj*. 2006; 74: 217-222.
- 65 Whang PG, Wang JC. Bone graft substitutes for spinal fusión. *Spine J*. 2003; 3: 155-165.
- 66 Constantino PD, Freidman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am*. 1997; 27: 1037-1073.
- 67 Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potencial of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*. 1982; 9: 257-65.
- 68 González Fernández D, Olmos Sanz G, López Niñoles C, Calzavara Mantovani D, Cabello Domínguez G. Membranas no reabsorbibles en Implantología. Razonamiento actual para su uso e indicaciones. *Periodoncia y Osteointegración* 2005; 15 (5): 1-14.
- 69 Fombellida Cortázar F, Martos Molino F. Cirugía mucogingival. 1ª ed. Victoria: Team work media España; 2004.
- 70 Misch CE, Soteranos G, Dietsh F. Capítulo 27: Injertos de hueso autógeno para implantes endoóseos: indicaciones, éxitos y fracasos. En: Carl E. Misch editor. *Implantología contemporánea*. 1ª ed. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1995. p. 593-614.
- 71 Boyne PJ. Capítulo 20: Injertos para aumentar y restaurar el reborde alveolar edéntulo: cirugía preprotésica a base de injertos óseos. En: Carl E. Misch editor. *Implantología contemporánea*. 1ª ed. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1995. p. 415-440.
- 72 Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthopaedica Belgica*. 2003; 69(1): 1-8.

- 73 Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001; 30 (3): 157-61.
- 74 Quereshty FA, Dhaliwal HS, El SA, Horan MP, Dhaliwal SS. Resorbable screw fixation for cortical onlay bone grafting: a pilot study with preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68 (10) :2497-502.
- 75 Abolfazli N, Saleh Saber F, Lafzi A, Eskandari A, Mehrasbi S. A Clinical Comparison of Cenobone (A Decalcified Freeze-dried Bone Allograft) with Autogenous Bone Graft in the Treatment of Two- and Three-wall Intrabony Periodontal Defects: A Human Study with Six-month Reentry. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2008; 2 (1): 1-8.
- 76 Wood RA, Mealey BL. Histologic comparison of healing after tooth extraction with ridge preservation using mineralized versus demineralized freeze-dried bone allograft. *J Periodontol*. 2012; 83 (3): 329-36.
- 77 Benezra Rosen V, Hobbs LW, Spector M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxiapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials* 2002; 23: 921-928.
- 78 Yamanouchi K, Yoshikawa Y. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) safety measures in Japan. *J Vet Med Sci*. 2007; 69 (1): 1-6.
- 79 Roy DM, Linnehan SA: Hydroxyapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermic exchange. *Nature* 1974; 247: 220-227.
- 80 Hulbert SF, Klawitter JJ. Tissue reaction to three ceramics of porous and non porous structures. *J Biomed Mater Res* 1972; 6: 347-74.
- 81 Hak DJ. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007; 15 (9) :525-36.
- 82 Ladd AL, Pliam NB. Use of bone-graft substitutes in distal radius fractures. *J Am Acad Orthop Surg*. 1999; 7 (5): 279-90.
- 83 Lizarbe MA. Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat*. 2007; 101 (1): 227-249.
- 84 Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012; 40 (5): 363-408.
- 85 Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4 (8): 743-65.
- 86 Shieh SJ, Vacanti JP. State of the art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery* 2005; 137 (1): 1-7.

- 87 Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G. Surface chemistry effects of topographic modification dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18 (1): 46-52.
- 88 Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng* 2005; 11 (5-6): 787-802.
- 89 Logeart-Avramoglou, Anagnostouf, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*. 2005; 9(1): 72-84.
- 90 Escudero ML, García-Alonso MC. Metales. En: María Vallet Regí, Luis Munuera editores. *Biomateriales: aquí y ahora*. 1ª ed. Madrid: Dykinson; 2000. p. 11-21.
- 91 García Cimbreló E. Cemento acrílico en cirugía ortopédica. En: María Vallet Regí, Luis Munuera editores. *Biomateriales: aquí y ahora*. 1ª ed. Madrid: Dykinson; 2000. Pag. 25-30.
- 92 Alberto Gallardo, Blanca Vázquez, Carlos Elvira, Julio San Román. Polímeros Biodegradables. En: María Vallet Regí, Luis Munuera editores. *Biomateriales: aquí y ahora*. 1ª ed. Madrid: Dykinson; 2000. Pag. 45-58.
- 93 Dressmann H: Ueber knochenplombierung. *Beitr Klin Chir* 1892; 9: 804-806.
- 94 Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991; 74 (7): 1487-1510.
- 95 Hench LL, Wilson J. Surface active biomaterials. *Science*. 1984; 226: 630-636.
- 96 Park JS, Suh JJ, Choi SH, Moon IS, Cho KS, Kim CK. Effects of pretreatment clinical parameters on bioactive glass implantation in intrabony periodontal defects. *J Periodontol* 2001;72:730-740.
- 97 Bonher M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J* 2001; 10: S114-S121.
- 98 LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.* 2008, 108: 4742-4753.
- 99 Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10:177-183.
- 100 De Groot K, Bioceramics of calcium phosphate. CRC Press, Boca Raton, 1983.
- 101 Geesink RGT, De Groot K. Bonding of bone to apatite coated implants. *J Bone Joint Surg Br*. 1988; 79: 17.
- 102 Holling JO, Brekke J. Role of bone substitutes. *Clin Orthop*. 1996; 324: 55-65.

- 103 Draenert M, Draenert A, Draenert K. Osseointegration of hydroxyapatite and remodeling-resorption of tricalciumphosphate ceramics. *Microsc Res Tech*. 2013; 6 (4): 370-80.
- 104 Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. *Biomatter*. 2012; 2 (4): 271-7.
- 105 Gomez Barrena E, Rodriguez Macías MJ. Recubrimiento de hidroxiapatita. En: María Vallet Regí, Luis Munuera editores. *Biomateriales: aquí y ahora*. 1ª ed. Madrid: Dykinson; 2000. p. 75-83.
- 106 Havelin LI, Engesaeter LB, Espehaug B, Furnes O, Lie SA, Vollset SE. The Norwegian Arthroplasty Register: 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta Orthop Scand*. 2000; 71: 337-353.
- 107 Strand Z, Strand J, Povysil C, Urban K. Effect of plasma sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15: 483-490.
- 108 Mortier A, Lemaitre J, Rodrique L, Rouxhet I. Synthesis and thermal behavior of well-crystallized calcium-deficient phosphate apatite. *J Solid State Chem*. 1989; 78: 215-219.
- 109 Mortier A, Lemaitre J, Rouxhet I. Temperature-programmed characterization of synthetic calcium-deficient phosphate apatites. *Thermochimica Acta* 1989; 143: 265-282.
- 110 Bohner M, Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*. 2005; 26 (13): 1553-63.
- 111 Grover LM, J.C. Knowlesb, G.J.P. Fleminga, J.E. Barraleta. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. 2003; 24 (23): 4133-41.
- 112 Xia Z, Grover LM, Huang Y, Adamopoulos IE, Gbureck U, Triffitt JT, Shelton RM, Barralet JE. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. *Biomaterials*. 2006; 27: 4557-4565.
- 113 Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006; 33(12):922-8.
- 114 Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005; 26(21):4383-94.
- 115 Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*. 2005; 26 (33): 6423-9.

- 116 Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone*, 1999; 25(2): 35–39.
- 117 Vallet Regí M. III. Matrices vítreas bioactivas: Liberación de antibióticos. En: María Vallet Regí, Antonio Luis Doadrino Villarejo editors. *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas*. 1ª ed. Madrid: Fundación Casares Gil; 2006. pag. 85- 109.
- 118 Schwarz K. A bound from of Si in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proc Nat Acad Sci USA* 1973; 70: 1608-1612.
- 119 Carlise E. Silicon as a trace nutrient. *Sci Total Environ* 1988; 73:95-106.
- 120 Jugdaohsingh R, Tucker K, Qiau N, Cupples L, Kiel D, Powell J. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *J Bone Miner Res*. 2004; 19:297-307.
- 121 Calomme M, Vanden-Berghe D. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56:153-165.
- 122 Hott M. Short term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1993; 53:174-179.
- 123 Schwarz K, Ricci BA, Punsar S, Karvonen MJ. Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in Finland. *Lancet* 1977; 1:538-539.
- 124 Carlisle EM. Silicon: A requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcif Tissue Int* 1981; 33:27-34.
- 125 Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. . Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003; 24(13):2161-75.
- 126 Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials*. 2003; 24(25):4609-20.
- 127 Pietak A. The role of silicon in Si-TCP bioceramics: a material and biological characterization. Kingston, Ont., Canada: Queen's University; 2004.
- 128 Delaney D, Constante B. Calcium phosphate cements prepared from silicate-phosphate solutions. *Patente* 2004;US2005009176.
- 129 Sayer M, Stratilatov A, Reid J, Calderin L, Stott M, Yin X, et al. Structure and composition of silicon stabilized tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2002; 24:369-382.
- 130 Porter A, Nanoscale characterization of the interface between bone and hydroxyapatite implants and the effect of silicon on the bone apposition, *Micron* 2006; 37:681-688.

- 131 Vandiver J, Dean D, Patel N, Botelho C, Best S, Santos J, et al. Silicon addition to hydroxyapatite increases nanoscale electrostatic, van der Waals and adhesive interactions. *J Biomed Res* 2005; 78A:352-363.
- 132 Reffitt D, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H, Evans B, Thompson R, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003; 32:127-135.
- 133 Sun J, Wei L, Liu X, Li J, Li B, Wang G, Meng F. Influences of ionic dissolution products of dicalcium silicate on osteoblastic proliferation, differentiation and gene expression. *Acta Biomaterialia* 2008, doi:10.1016/j.actbio.2008.10.011.
- 134 Keeting P, Oursler M, Wiegand K, Bonde S, Spelsberg T, Riggs B. Zeolite A increases proliferation, differentiation and TGF-beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 1992; 7:1281-1289.
- 135 Xynos I, Edger A, Buttery D, Hench L, Polak J. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:151-157.
- 136 Valerio P, Pereira M, Goes A, Leite M. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials* 2004; 25:2941-2948.
- 137 Mastrogiacoma M, Corsi A, Francioso E, Di Comite M, Monetti F, Scaglione S, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using reabsorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng* 2006; 12:1261-1273.
- 138 Bohner M. Silicon-substituted calcium phosphates: A critical review. *Biomaterials* 2009; 30(32):6403-6.
- 139 Huang Z, Chang J. Novel bioactive composite bone cements based on the β -tricalcium phosphate monohydrate composite cement system. *Acta Biomater* 2009; 5:1253-1264.
- 140 Davil Ball. Estado Sólido: Cristales. En: David Ball, Físicoquímica. 1ª ed. Mexico DF: Thomson; 2005. p. 731-764.
- 141 Dickens B, Schroeder LW, Brown WE. Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *J Solid State Chem* 1974;10:232-248.
- 142 Ramón Fernández Ruiz. Seminarios “El metodo de rietveld” [Internet] Madrid: SIDI-UAM 2004 [Consulta el 10 de Mayo de 2013]. Disponible a: www.uam.es/personal_pas/txrf/rietveld/Rietveld.htm.
- 143 Young RA. The Rietveld Method, International Union Crystallography, Oxford Science Publications, 1995.

- 144 Xin Y, Ye F, Cai S, Yao K, Cui J, Song X. Gelatin manipulation of latent macropores formation in brushite cement. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:255-261.
- 145 Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement Paste by Vicat Needle, ASTM C191-92, Annual Book of ASTM Standards, vol. 04.01: Cement, Lime, Gypsum. Philadelphia: ASTM; 1993:158-160.
- 146 Lowell S, Shields JE. Powder surface area and porosity. New York, Chapman and Hall, 1984
- 147 Van Brakel J, Modry S, Svata M. Mercury porosimetry: state of art. *Powder Technology*, 1981;29(1):1-12.
- 148 Cook TL, Komodromos C, Quinn DF, Ragan S. En: Burchell, T.D. editores. *Carbon Materials for Advanced Technologies*. New York : Pergamon, Elsevier Science; 1999. p. 269-302.
- 149 Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*. 1938;60: 309-319.
- 150 Barron M, Franklin L, Woodall J Jr, Wingerter S, Benghuzzi H, Tucci M. Comparison of osteoconductive materials on MG63 osteoblast cell function. *Biomed Sci Instrum*. 2007; 43: 248-53.
- 151 Otsuka M, Matsuda Y, Yu D, Wong J, Fox JL, Higuchi WI: A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement. *Chem Pharm Bull*. 1990; 38: 3500-3502.
- 152 Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler Jm. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin. *Biomaterials*. 2003; 24 (7): 1265-1270.
- 153 Xu S, Lin K, Wang Z, Chang J, Wang L, Lu J, et al. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*. 2008; 29: 2588-96.
- 154 Tang XL, Xiau XF, Liu RF. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method. *Materials letters*. 2005; 59: 3841-3846.
- 155 Dickens B, Brown WE. The Crystal Structure of $\text{Ca}_5(\text{P}_4\text{O}_{14})_2\text{SiO}_4$ (Silico-Carnotite). *Tsehermaks Min Petr Mitt*. 1971; 16: 1-27.
- 156 Palard M, Combes J, Champion E, Foucaud S, Rattner A, Bernache-Assollant D. Effect of silicon content on the sintering and biological behavior of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{x}(\text{SiO}_4)\text{x}(\text{OH})_{2-\text{x}}$ ceramics. *Acta Biomaterialia* 2009; 5: 1223-1232.
- 157 Nasser YM, Hassanb HM, Mohamed FH. Sintering behavior and thermal stability of Na^+ , SiO_4^{4-} and CO_3^{2-} co-substituted hydroxyapatites. *Journal of Alloys and Compounds*. 2009; 479 :692–698.

- 158 Duan W, Ning C, Tang T. Cytocompatibility and osteogenic activity of a novel calcium phosphate silicate bioceramic: Silicocarnotite. J Biomed Mater Res A. 2012 Dec 5. doi: 10.1002/jbm.a.34497.
- 159 Hristov V, Radev L, Samuneva B, Apostolov G. Organic/ inorganic bioactive materials Part I: Synthesis, structure and *in vitro* assessment of collagen/ silicocarnotite biocoatings. Cent Eur J Chem 2009; 7(4): 702-710.
- 160 Balas F, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M.J. In vitro bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites. Biomed Mater Res A. 2003 Aug 1;66(2):364-75.
- 161 Ruys AJ. Silicon-doped hydroxyapatite. J. Aust. Ceram. Soc 1993; 29: 7 -80.
- 162 Houston JR, Maxwell RS, Carroll SA. Transformation of meta-stable calcium silicate hydrates to termorite: reaction kinetics and molecular structure from XRD and NMR spectroscopy. Geochem Trans 2009; 10:1-14.
- 163 Nonat A. The structure and stoichiometry of C-S-H. Cement and Concrete Research 2004; 34: 1521-1528.
- 164 Taylor HFW. Proposed structure for calcium silicate hydrate gel. J Am Ceram Soc. 1986; 69 (6): 464-467.
- 165 Damen JJM, Cate JMT. The effect of silicic acid on calcium phosphate precipitation. J Dent Res 1989; 68:1355-1359.
- 166 Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. Proc Instn Mech Engrs [H] 1998; 212:427-435.
- 167 van den Vreken NMF, Pieters IY, Declercq HA, Cornelissen MJ, Verbeeck RMH. Characterization of calcium phosphate cements modified by addition of amorphous calcium phosphate. Acta Biomater 2009, 6(2):617-25.
- 168 Barralet JE, Tremayne M, Lilley KJ, Gbureck U. Modification of calcium phosphate cement with α -hydroxy acids and their salts. Chem Mater 2005;17:1313-1319.
- 169 Mariño FT, Torres J, Hamdan M, Rodríguez CR, Cabarcos EL. Advantages of using glycolic acid as retardant in a brushite forming cement. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007; 83: 571-9.
- 170 Hofmann MP, Lilley KJ, Gbureck U, Barralet JE. Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants. In: Proceedings of the 19th european conference on biomaterials. Naples; 2005. Paper No. P418 411.
- 171 Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid. J Non-Cryst Solids 1992; 143:84-92.
- 172 Hassan KAR. The microelectrophoretic behavior of sparingly soluble salts [Tesis doctoral]. NY: SUNY, Buffalo; 1984.

- 173 Grover LM, Gbureck U, Young AM, Wright AJ, Barralet JE. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-pyrophosphoric acid bone cement. *J Mater Chem*. 2005; 15: 4955-62.
- 174 Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 1970; 4(3): 433-56.
- 175 Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474-91.
- 176 Itala AI, Ylanen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(6):679-83.
- 177 Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface* 2009; 6: S341-S348.
- 178 Lopez-Heredia MA, Sariibrahimoglu K, Yang W, Bohner M, Yamashita D, Kunstar A, van Apeldoorn AA, Bronkhorst EM, Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Itatani K, Yang F, Salmon P, Wolke JG, Jansen JA. Influence of the pore generator on the evolution of the mechanical properties and the porosity and interconnectivity of a calcium phosphate cement. *Acta Biomater*. 2012;8(1):404-14.
- 179 Gbureck U, Vondran E, Müller FA, Barralet JE. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J Control Release* 2007; 122:173-180.
- 180 Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10:169-176.
- 181 Gibson IR, Best SM, Bonfield W. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1999; 44:422-8.
- 182 Panzavolta S, Torricelli P, Bracci B, Fini M, Bigi A. Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells. *J Inorg Biochem* 2009;103(1):101-6.
- 183 Engel E, Del Valle S, Aparicio C, Altankov G, Asin L, Planell JA, Ginebra MP. Discerning the role of topography and ion exchange in cell response of bioactive tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(8):1341-51.
- 184 Capuccini C, Torricelli P, Boanini E, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 89(3): 594-600.
- 185 Xu L, Khor KA. Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method. *J Inorg Biochem* 2007; 101:187-95.

- 186 Byun I-S, Sarkar SK, Jyoty MA, Min Y-K, Seo H-S, Lee B-T, Song H-Y. Initial biocompatibility and enhanced osteoblast response of Si doping in a porous BCP bone graft substitute. *J Mater Sci: Mater Med* 2010; 19:37-1947.
- 187 Botelho C, Brooks R, Spence G, McFarlane I, Lopes M, Best S, et al. Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*. 2006;78:709–20.
- 188 Guth K, Buckland T, Hing KA. Protein adsorption and early osteoblastic behaviour on phase pure hydroxyapatite (HA) and silicon substituted hydroxyapatite (SiHA). In: 19th European conference on biomaterials 2005, Sorrento, 2005.
- 189 Shuxin Zhou, Jingzhi Ma, Ya Shen, Markus Haapasalo, N Dorin Ruse, Quanzu Yang, Tom Troczynski. In vitro studies of calcium phosphate silicate bone cements. *J Mater Sci: Mater Med* 2013; 24:355-364.
- 190 Shie MY, Ding SJ, Chang HC. The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. *Acta biomater* 2011; 7:2604-14.
- 191 Moreau JL, Weir MD, Xu HHK. Self-setting collagen-calcium phosphate bone cement: mechanical and cellular properties. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91 (2): 605-613.
- 192 Gbureck U, Vorndran E, Barrelet JE. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomaterialia* 2008; 4: 1480-1486.
- 193 Le Geros RZ, Le Geros JP. Dense hydroxyapatite. In: Hench LLWJ, editor. *An introduction to bioceramics*. Singapore: World scientific; 1993. P. 139-180.
- 194 Costerton J. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2005;437:7-11
- 195 Gautier H, Daculsi G, Merle C. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and microbiological activity. *Biomaterials* 2001; 22:2481-2487.
- 196 Hamel A, Caillon J, Jacqueline C, Rogez J-M, Potel G. Internal device decreases antibiotic's efficacy on experimental osteomyelitis. *J Child Orthop* 2008; 2: 239-243.
- 197 Hofmann MP, Mohammed AR, Perrie Y, Gbureck U, Barrelet JE. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. *Acta Biomaterialia* 2009; 5(1):43-9.
- 198 Böhner M, Lemaître J, van Languyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B. Gemtamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cements and antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 1997; 86:565-572.
- 199 Antonio L. Doadrio Villarejo, Juan Carlos Doadrio Villarejo. II. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos en la liberación controlada de fármacos en materiales mesoporosos ordenados. En: María Vallet Regí, Antonio Luis Doadrio Villarejo

editors. Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas. 1ª ed. Madrid: Fundación Casares Gil; 2006. p. 65- 83.

200 Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *Journal of controlled release* 2006; 113: 102-110.

201 El-Ghannam A, Jahed K, Govindaswami M. Resorbable bioactive ceramic for treatment of bone infection. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:308-316.

202 Schnieders J, Gbureck U, Thull R, Kissel T. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement. *Biomaterials* 2006; 27:4239-4249.

203 Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Nagayama M, Kon M, Asaoka K, Suzuki K. Effects of added antibiotics on the basic properties of antiwashout-type fast-setting calcium phosphate cement. *Journal of biomedical Materials Research* 1998; 39 (2): 308-316.

204 Ratier, Gison IR, Best SM, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F. Behaviour of calcium phosphate bone cement containing tetracycline hydrochloride or tetracycline complexed with calcium ions. *Biomaterials* 2001; 22: 897-901.

205 Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T. A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *Journal of biomedical materials research, applied biomaterials* 1996; 33(3): 139-143.

206 Otsuka M, Nakahigashi Y, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Sugiyama Y. Effect of geometrical cement size on in vitro indomethacin release from self-setting apatite cement. *J control Release* 1998; 52 (3): 281-289.

207 Otsuka M, Nakahigashi Y, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Sugiyama Y. A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement VIII: the relationship between in vitro and in vivo drug release from indomethacin-containing cement. *J control release* 1997; 43(2-3): 115-122.

208 Otsuka M, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI. Novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement IX: effects of the mixing solution volume on anticancer drug-release from homogeneous drug-loaded cement. *J Pharm Sci* 1995; 84(6): 733-736.

209 Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI. A novel drug-delivery system using self-setting calcium-phosphate cement IV: Effects of the mixing solution volume on the drug-release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement. *J Pharm Sci* 1994; 83(2): 259-263.

210 Bohner M, Lemaître J, Merckle HP, Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate admixed poly(acrylic acid). *J pharm Sci* 200; 89(10): 1262-1270.

211 Suzuki T, Arai K, Goto H, Hanano M, Watanabe J, Tomono K. Dissolution test for self-setting calcium phosphate cement-containing nifedipine. *Chem Pharm Bull* 2002; 50(6): 741-743.



- 212 Velich N, Németh Z, Tóth C, Szabó G. Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. *J Craniofac Surg* 2004;15(1):38-41.
- 213 Herron S, Thordarson DB, Winet H, Luk A, Bao JY. Ingrowth of bone into absorbable bone cement: an in vivo microscopic evaluation. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2003;32(12):581-4.
- 214 Bohner M, Matter S. Brushite hydraulic cement stabilized with a magnesium salt. US Patent 6733582 (2004).
- 215 Tamimi Mariño F. Síntesis, caracterización y aplicación en regeneración ósea de cementos de brushita fraguados con ácidos orgánicos, geles y coloides. Tesis Doctoral. UCM. 2006.
- 216 Frame JH. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980;38:176-180.
- 217 Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineralin guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(6):795-806.
- 218 Stevenson S: Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30: 543-52.
- 219 Friedlaender GE: Bone grafts: The basic science rationale of clinical applications. *J Bone Joint Surg* 1987; 69 A: 786-90.
- 220 Burwell RG. Osteogenesis in cancellous bone graft: Considered in terms of cellular changes, basic mechanisms and the perspective of growth control and its possible aberrations. *Clin Orthop* 1965;40:35-40.
- 221 Ruhé PQ, Kroese-Deutman HC, Wolke JG, Spauwen PH, Jansen JA Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials*. 2004; 25(11):2123-32.
- 222 Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaître J, Pasquier G, Flautre B. J Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *Biomed Mater Res*. 1996 Feb;30(2):193-200.
- 223 Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, et al. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res* 1998; 43: 451-461.
- 224 Kurashina K, Kurita H, Kotani A, Kobayashi S, Kyoshima K, Hirano M: Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an tricalcium phosphate dicalcium phosphate dibasic tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits. *Biomaterials* 1998; 19: 701-706.
- 225 Sohn J-Y, Park J-C, Um Y-J, Jung U-W, Kim C-S, Cho K-S, Choi S-H. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci* 2010;40:180-187.

- 226 Humber GKB, Craig C, Sándor G, Davis JM, Sean A, Peel F et al. Bone healing with an in situ–formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:372-384.
- 227 Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sándor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002;13:111-21.
- 228 Jan AM, Sándor GK, Iera D, Mhawi A, Peel S, Evans AW, et al. Hyperbaric oxygen results in an increase in rabbit calvarial critical sized defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:144-9.
- 229 Park J-W, Kim E-S, Jang J-H, Suh J-Y, Park K-B, Hanawa T. Healing of rabbit calvarial bone defects using biphasic calcium phosphate ceramics made of submicron-sized grains with a hierarchical pore structure. *Clin Oral Impl Res.* 2010; 21:268–276.
- 230 Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2009; 38: 356–362.
- 231 Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, Wiltfang J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1):7-13
- 232 Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994 Dec;23(6 Pt 2):395-8.
- 233 Rabie AB, Lie Ken Jie RK. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Aug;25(4):311-8.
- 234 Noetzel J, Ozer K, Reissbauer BH, Anil A, Rössler R, Neumann K et al. Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2006; 10(1): 77-83.
- 235 Yuan H, Li Y, De Bruijn JD, De Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* 2000; 21: 1283-90.
- 236 Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:E74-E87.
- 237 Yang R, Davies CM, Archer CW, Richards RG. Immunohistochemistry of matrix markers in technovit 9100 new embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mat* 2003;6:57-71
- 238 Kruse A, Jung R, Nicholls F, Zwahlen, Hammerle C, Weber F. Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide- based and a xenogenic hydroxyapatitebased bone substitute material. *Clin Oral Implant Res.* 2011;22: 506–511.

- 239 Elliot JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates. Amsterdam: Elsevier; 1994.
- 240 Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? Phil Trans R Soc Lond A 2004; 362: 2821-2850
- 241 Harrison MA, Rae IF. General techniques of cell culture: Cambridge University Press; 1997.

XII.- TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS

PATENTE: López Cabarcos E, Hamdan Ali Alkhraisat M. Cemento de fosfato cálcico-silicato cálcico para aplicaciones biomédicas. PCT/ES2011/000228 (2012).

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)	
(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual Oficina internacional	
(43) Fecha de publicación internacional 19 de enero de 2012 (19.01.2012)	(10) Número de Publicación Internacional WO 2012/007612 A1
	
(51) Clasificación Internacional de Patentes: A61L 27/12 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01)	(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2011/000228	(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Fecha de presentación internacional: 15 de julio de 2011 (15.07.2011)	Publicada: — con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3)) — antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
(25) Idioma de presentación: español	
(26) Idioma de publicación: español	
(30) Datos relativos a la prioridad: P201000915 16 de julio de 2010 (16.07.2010) ES	
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Avda. Séneca, 2, 28040 Madrid (ES).	
(72) Inventores: e	
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): HAMDAN ALI ALKHRAISAT, Mohammad [ES/ES]; Facultad de Farmacia de la Universidad, Complutense de Madrid, Avda. Complutense, S/N, 28040 Madrid (ES). LÓPEZ CABARCOS, Enrique [ES/ES]; Facultad de Farmacia de la Universidad, Complutense de Madrid, Avda. Complutense, S/N, 28040 Madrid (ES).	
(74) Mandatario: PLUMET ORTEGA, Joaquín; Vicerrector de Investigación de la, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Séneca, 2, 28040 Madrid (ES).	
(54) Title: CALCIUM PHOSPHATE/CALCIUM SILICATE CEMENT FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS	
(54) Título : CEMENTO DE FOSFATO CÁLCICO-SILICATO CÁLCICO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS	
(57) Abstract: The present invention relates to a calcium phosphate/calcium silicate cement that comprises a 10 to 90% by volume fraction of silicon-doped brushite (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a hydrated calcium silicate fraction (C-S-H) and a further fraction comprising hydroxyapatite. In addition, the invention relates to a method for preparing said cement and to the composite ceramic comprising beta tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) doped with silicon and silicocarnotite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$), which is the result of the first step in said method. The present invention also relates to the use of matrices that include the cement or the ceramic in the preparation of therapeutic agents for maxillofacial and oral surgery, orthopaedic applications and/or controlled release of drugs, and also in tissue and bone engineering as cell-growth substrate.	
(57) Resumen: La presente invención se refiere a un cemento de fosfato cálcico-silicato cálcico que comprende una fracción de volumen del 10 al 90% de brushita (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dopada con silicio, una fracción de silicato cálcico hidratado (C-S-H) y otra fracción de hidroxiapatita. Así mismo, la invención se refiere a un método para elaborar dicho cemento y a la cerámica compuesta de fosfato tricálcico beta ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) dopado con silicio y silicocarnotita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) que resulta del primer paso de dicho método. La presente invención también se refiere al uso de matrices que incluyen el cemento o la cerámica en la elaboración de agentes terapéuticos para cirugía maxilofacial y oral, aplicaciones ortopédicas y/o liberación controlada de medicamentos, así como en ingeniería tisular y ósea como soporte para el crecimiento de células.	

WO 2012/007612 A1

PUBLICACIONES:

2009:



M. Hamdan Alkhraisat, C. Rueda, J. Cabrejos-Azama, **J. Lucas-Aparicio**, F. Tamimi Mariño, J. Torres García-Denche, L. Blanco Jerez, U. Gbureck, E. Lopez Cabarcos. *Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement*. Acta Biomater (2009), 6(4):1522-8.

Acta Biomaterialia 6 (2010) 1522–1528

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actabiomat



Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement

M. Hamdan Alkhraisat^{a,*}, C. Rueda^a, J. Cabrejos-Azama^{a,b}, J. Lucas-Aparicio^{a,b}, F. Tamimi Mariño^c, J. Torres García-Denche^d, L. Blanco Jerez^b, U. Gbureck^e, E. Lopez Cabarcos^a

^a Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, UCM, 28040 Madrid, Spain
^b Departamento de Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, 28040 Madrid, Spain
^c Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, QC, Canada
^d Departamento de Ciencias de la Salud III, Facultad de Ciencias de la Salud, URJC, Alcorcón-Madrid, Spain
^e Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, 97070 Würzburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 August 2009
Received in revised form 22 October 2009
Accepted 23 October 2009
Available online 30 October 2009

Keywords:
Calcium phosphate cement
Ionic substitution
Strontium
Drug release
Doxycycline hyclate

ABSTRACT

Novel Sr-substituted calcium phosphate cement (CPC) loaded with doxycycline hyclate (DOXY-h) was employed to elucidate the effect of strontium substitution on antibiotic delivery. The cement was prepared using as reactants Sr-substituted β -tricalcium phosphate (Sr- β -TCP) and acidic monocalcium phosphate monohydrate. Two different methods were used to load DOXY-h: (i) the adsorption on CPC by incubating the set cement in drug-containing solutions; and (ii) the use of antibiotic solution as the cement liquid phase. The results revealed that the Sr-substituted cement efficiently adsorbs the antibiotic, which is attributed to an enhanced accessibility to the drug-binding sites within this CPC. DOXY-h desorption is influenced by the initial adsorbed amount and the cement matrix type. Furthermore, the fraction of drug released from CPCs set with DOXY-h solution was higher, and the release rate was faster for the CPC prepared with 26.7% Sr- β -TCP. The analysis of releasing profiles points to Fickian diffusion as the mechanism responsible for antibiotic delivery. We can conclude that Sr substitution in secondary calcium phosphate cements improves their efficiency for DOXY-h adsorption and release. The antibiotic loading method provides a way to switch from rapid and complete to slower and prolonged drug release.

© 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Osteotransductive calcium phosphate cements (CPCs) are suitable materials for local delivery systems in osseous tissue since they can simultaneously promote bone regeneration and prevent infectious diseases by releasing therapeutic agents. Recent advances in CPC technology have resulted in the enhancement of the handling, application and osteoconductive properties of these cements [1]. These improvements have permitted CPCs to be assayed as carriers for local delivery of drugs and biologically active substances such as growth factors [1]. Local drug delivery is especially valuable in bone infection since it spares patients the adverse effects of systemically administered drugs, reduces the risks from resistant bacteria and enables high concentration of medicament at the infection site [2,3].

Most drug-delivery systems of clinical use are based either on polymers such as polymethylmethacrylate cement (PMMA) [4] and resorbable polylactic-co-glycolic acid (PLGA) [5], or on ceramic

materials such as nanoporous alumina [6], silicon carbide [7] and calcium phosphates [8]. Many studies have investigated combinations of therapeutic agents with different calcium phosphates such as sintered hydroxyapatite (HA) [9], precipitated amorphous calcium phosphate [10], biphasic calcium phosphate [11] and calcium polyphosphates [12]. Otsuka et al. proved the efficiency of CPCs as vehicles for local delivery systems [13]. The success of this idea was favored by the easy incorporation of pharmaceutical and biological substances into the cement solid or liquid phases, the intimate adaptation of the cement paste to bone defects and the high cement porosity which permits the release of the entrapped substance to the local environment [14]. Furthermore, low-temperature setting of CPCs allows the incorporation of heat-labile medicaments and substances into the cement matrix during its preparation.

Secondary CPCs that set by the entanglement of brushite crystals ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) are gaining interest as drug-delivery systems [15–20] mainly due to their biodegradability [21]. Water forms part of the setting reaction of brushite cements, and enables adjustment of the cement porosity, a determinant factor for the release kinetics of the loaded drug [20]. Investigation of

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3941751; fax: +34 91 3942032.
E-mail address: mkhraisat@farmacia.ucm.es (M.H. Alkhraisat).

1742-7061/\$ – see front matter © 2009 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.actbio.2009.10.043

2013:


Julia Lucas-Aparicio, Jatsue Cabrejos-Azama, Mohammad Alkhraisat, , Carmen Rueda, Luis Blanco-Jerez, Enrique Lopez-Cabarcos. *Tissue engineering: a new silicon-doped calcium phosphate cement's scaffold in combination with adipose derived stem cells. Póster: 418. Topic: Tissue augmentation and engineering. 22th European Association for osseointegration, Dublin, 17-19 October, 2013.*

418

TISSUE ENGINEERING: A NEW SILICON-DOPED CALCIUM PHOSPHATE CEMENT'S SCAFFOLD IN COMBINATION WITH ADIPOSE DERIVED STEM CELLS

Julia Lucas-Aparicio^{1,2}, Jatsue Cabrejos-Azama^{1,2}, Mohammad Alkhraisat¹, Carmen Rueda¹, Luis Blanco-Jerez², Enrique Lopez-Cabarcos¹

¹ Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain
² Departamento de Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain



Topic: Tissue augmentation and engineering

Abstract

The purpose of regenerative medicine is the development of an efficient scaffold that permits stem cells proliferation and differentiation toward target cells to regenerate lost tissue. Calcium phosphate cements promote osteoconduction and serve as mold structures to facilitate osteogenesis. The substitution of silicon into calcium phosphates increases implant-tissue interaction promoting bone regeneration since silicon is an essential trace element for the metabolic processes associated with the development of bone and connective tissue⁽¹⁾. The abundance and accessibility of adipose-derived stem cells (ADSCs) may prove to be desirable cell therapeutics for bone repair and regeneration. Studies have shown that ADSC have similar immunophenotype, multilineage potential, and transcriptase compared to bone marrow derived MSC (BMSC)⁽²⁾.


Background and Aim

We fabricated silicon-doped calcium phosphate cements (Si-CPC) in combination of rabbit adipose-derived stem cells that may improve in vivo performance.

Methods and Materials


Calcium phosphate-calcium silicate composite:

The calcium phosphate cement (CPC) was obtained by mixing the SiO₂ with β-TCP and monocalcium phosphate monohydrate; this mixture is reacted with 1M citric acid at a powder to liquid ratio of 1.5 g.m³ (Fig.1 and 2). Structural characterizations were carried out using X-ray diffraction




In Vivo:

Adipose stem cells were obtained from subcutaneous adipose peritoneal tissue site of New Zealand White rabbits. A longitudinal incision was performed 2 to 3 cm in the adipose peritoneal tissue, where is located the adipose panicle, with the aim to remove the desired fat (lipectomy) (Fig. 3). The adipose tissue was fragmented into small pieces (Fig. 4) and they were placed in 50 ml Falcon tubes with 20 ml of Hank's balanced solution with antibiotics and collagenase type 1A, which were maintained under constant heat in a sterilized bath without shaking. The cell suspension was then centrifuged (Fig. 5). The pellet (stromal-vascular fraction) was collected and the cells were suspended in 20 ml medium.



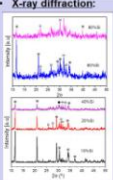
The cements were tested in vivo as bone substitutes in two titanium cylinders that were fixed into perforated slits made, using a trephine, on the parietal cortical bone of each New Zealand rabbits, on each side of the median sagittal suture. One cylinder was filled only with Si-CPC and the other was filled with Si-CPC and then ADSCs were applied with a syringe to the material.



The animals were put down after 8 weeks, bone samples were dehydrated and embedded in 2-hydroxy-ethyl-methacrylate. A microtome was used to cut coronal sections from the cylinders. Afterwards, surface staining was performed with toluidine blue. The histological evaluation of bone neoformation was carried out by optical microscopy.

Results and Discussion

X-ray diffraction:

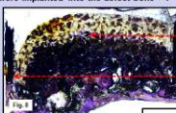
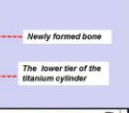


The results of X-ray diffraction patterns of CPCs prepared with TCP of Si content ranged between 10-80% indicated the formation of a cement matrix composed of crystalline elements: brookite (†), unreacted β-TCP (‡), HA (+), silicocementite (x), monelite (x), calcium silicate hydrate (C-S-H) at 2θ=29.6, especially at high Si content, and amorphous phases (Fig. 7).

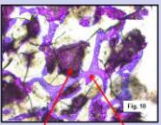
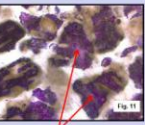
In Vivo:

Histological evaluation:

The bone-conduction chamber is the best model for evaluating true vertical bone augmentation because the edges of the bone defect were clearly limited by the walls of the titanium cylinder (R). In our study the cylinder was filled first with Si-CPC and then applied ADSCs with a syringe on the biomaterial. This was an efficient method to include the ADSCs into the material. In others studies ADSCs were cultured on the scaffolds and then were implanted into the defect bone (5).

The bone substitutes interacted efficiently with the surrounding bone. These cements present slower degradation rates. The remaining granules of Si-CPC were observed over the whole specimen area. We can see that the samples with stem cells have more vertical bone growth than Si-CPC without ADSCs (Figs 8 and 9), thus the ADSCs could induce the formation of more bone tissue. In the ADSCs samples we can observe that bony bridges were established between the cement granules (Fig. 10).

Remaining cement granule Newly formed bone Remaining cement granules

Fig. 10: Image of histological Si-CPC with ADSCs using a 10X objective.
 Fig. 11: Image of histological Si-CPC without ADSCs using a 10X objective.

Conclusions

The abundance and accessibility of adipose derived stem cells (ADSC) may prove to be novel cell therapeutics for bone repair and regeneration. The development of biomaterials with silicon ions with ADSCs have a positive influence on hard tissue development. In this pilot study we include stem cells with biomaterials with good results. We can conclude that this new cement could be a promising material in bone engineering.

References

1. Alkhraisat MH et al. Acta Biomaterialia 2010; 6:257-265.
2. Rajeswari Ravichandran et al. Biomaterials 2012; 33: 846-855.
3. Slotte C et al. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 2003; 18: 795-806.

Presented at the 22nd Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration
 17-19 October 2013, Dublin, Ireland

EAO

232

Julia Lucas-Aparicio, Mohammad H Alkhraisat, Carmen Rueda, Uwe Gbureck, Andrea Ewald, Luis Blanco Enrique y López-Cabarcos. *Comportamiento in vitro y liberación de antibióticos en cemento de fosfato cálcico- silicato cálcico*. Comunicación oral. Materials week, Universidad politécnica de Madrid, Spain. 26 –30 de Abril. 2013.

Abstract:

Title: A NOVEL CALCIUM PHOSPHATE-CALCIUM SILICATE COMPOSITE: BIOLOGICAL PERFORMANCE AND ANTIBIOTIC RELEASE

Silicon was an essential trace element for metabolic processes associated with the development of bone and connective tissues. Bio-inspired silicon substitution in calcium phosphates generates biomaterials that vary in their physico-chemical and biological properties and enhances implant-tissue interaction favoring bone regeneration.

The variation of silicon ions content in bioceramics will give result to a biocements with controllable properties and improved in vivo performance. Silicon-doped calcium phosphate ceramics were mixed with acidic calcium phosphate to produce inorganic matrix of brushite and calcium silicate hydrate (C-S-H). The analysis of X-ray diffraction patterns of Si-doped CPCs was characterized by the presence of brushite and hydroxylapatite especially at high Si content. The shorter setting time and lower tensile strength of this cement are associated with the high silicon content. The kinetics of antibiotic release is switched from rapid release with an initial burst to zero-order release kinetic. The growth of osteoblasts on cement surfaces showed higher proliferation and activity at higher silicon content.

A novel cement system was developed to produce a composite of brushite and C-S-H. The silicon ions released from Si-doped cements resulted in significant enhancement of osteoblast activity and proliferation. We conclude that this new cement system could be a promising material in bone engineering.

Vancomycin loaded Mg substitution Calcium Phosphate Cement for the Treatment of Staphylococcus Aureus Infections

Jatsue Cabrelos-Azama^{1,2}, Mohammad Hamdan Alkhraisat¹, Julia Lucas-Aparicio^{1,2}, Carmen Rueda¹, Concepción Pintado³, Luis Blanco², Enrique Lopez-Cabarcos¹.

¹ Departamento de Física-Química II. Facultad de Farmacia, UCM, Spain

² Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología, UCM, Spain

³ Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia, UCM, Spain

jacaza@farm.ucm.es

INTRODUCTION

Sometimes, bone regeneration surgeries have complications such as bacterial infection, local inflammation, bone destruction and impaired bone healing¹. Treatment of these complications systemically can be difficult because it requires the systemic drug administration. However, any treatment, whether intravenous, intramuscular or oral applied, has limitations, such as low drug solubility, poor biodistribution, lack of selectivity, uncontrolled pharmacokinetics and serious side effects in non-target tissues. To address this, local drug delivery of antibiotics at the surgery site is currently used. Calcium phosphate cements (CPC) have been considered good candidates for this purpose.

The aim of this paper was to assess the effect of different amounts of magnesium incorporate into CPC as drug delivery system potential.

EXPERIMENTAL METHODS

Different concentrations of Mg substituted tricalcium phosphate (β -TCP, 26.67% Mg-TCP, 40% Mg-TCP and 66.67% Mg-TCP) powder were synthesized and mixed with monocalcium phosphate and reacted with water to obtained cement samples².

The vancomycin was loaded into cements samples by incorporation to the solid phase of the cement (2g vancomycin for each 40g of the powder phase of the cement). Loaded samples were incubated in phosphate buffer solution and drug release was monitored using UV-VIS spectroscopy and measured at $\lambda=237$ nm. Moreover, we studied the antibacterial activity of samples on blood-agar plates seeded with *Staphylococcus aureus*.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the release profile. Significant differences can be observed in the release profile of the antibiotic. The cement control releases 50% of the antibiotic in the first 24 hours. The cement prepared with 26.67% Mg-TCP presents an abrupt release of vancomycin, reaching 50% of the antibiotic released after 3 hours. However, the increasing magnesium content changes the release profile. The cement prepared with 40% Mg-TCP released 50% of vancomycin in the first 50 hours and reached to release 90% at 96 hours of testing. The cement prepared with 66.67% Mg-TCP has a lower release profile, 50% within 72 hours reaching 90% at 168 hours.

These changes in drug release kinetics could be related to the increasing magnesium content into the cement that decreases its porosity and modified the cement specific

surface area (SSA) (see Table 1) as has been reported recently².

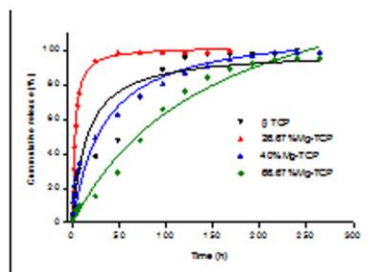


Figure 1. Drug release from CPCs prepared with β -TCP, 26.67% Mg-TCP, 40% Mg-TCP and 66.67% Mg-TCP.

Table 1. Porosity, average pore diameters and specific surface area of Mg-doped-CPCs

CPC made with	Hg Porosity	Average pore diameter (4V/A)	SSA (m ² /g)
β -TCP	44%	0.65 μ m	5.10 \pm 0.01
26.67% Mg-TCP	45%	1.07 μ m	5.85 \pm 0.01
40% Mg-TCP	38%	0.64 μ m	1.80 \pm 0.01
66.67% Mg-TCP	27%	0.07 μ m	0.55 \pm 0.004

The antimicrobial activity of the released vancomycin was evidenced by the production of inhibition zone of *Staphylococcus aureus* growth (Fig. 2).

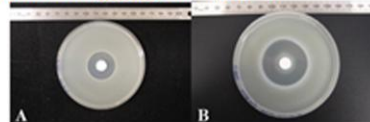


Figure 2. Antimicrobial activity of vancomycin released for CPC without magnesium A and CPC with 26.67% Mg-TCP.

REFERENCES

- 1 Miclau T. et al., J Orthop Trauma (2010) 24:583-586.
- 2 Alkhraisat M. et al., Mater Sci Eng C (2013) 33:475-481

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MAT2010-15349).

2012:

Jatsue Cabrelos-Azama, **Julia Lucas-Aparicio**, Carmen Rueda, Jesus Torres, Luis Blanco, Mohammad Hamdan Alkhraisat, Enrique López Cabarcos. *Tuning bone grafts to their clinical destiny: comparative study of magnesium and silicon substitution*. 9th World Biomaterials Congress. Chengdu, China, Junio 1-5, 2012.

Tuning bone grafts to their clinical destiny: comparative study of magnesium and silicon substitution

Jatsue Cabrelos-Azama^{1,2}, Julia Lucas-Aparicio^{1,2}, Carmen Rueda¹, Jesus Torres³, Luis Blanco², Mohammad Hamdan Alkhraisat¹, Enrique López Cabarcos¹.

¹ Departamento de Física-Química II. Facultad de Farmacia, UCM, Spain

² Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología, UCM, Spain

³ Facultad de Ciencias de la Salud, URJC, Spain

mkhresat@farm.ucm.es

Introduction

The use of bone regeneration procedures is becoming a daily practice in orthopedic and maxillofacial surgery motivated by the wide acceptance of dental implants as an option for oral rehabilitation. Ionic substitution is proposed to achieve higher efficiency and the reduction of time necessary to complete bone regeneration. We achieved substitution of magnesium and silicon in bioceramics based on β -tricalcium phosphate. As far as we know this is the first research to compare the efficiency of magnesium and silicon substitution to enhance the osteoconduction of calcium phosphate bone substitute.

Materials and methods

β -TCP is prepared by the calcinations of brushite and calcium carbonate mixture of a molar ratio of 1.5. Ionic-doped ceramics were prepared by substituting brushite with SiO_2 for silicon substitution or with $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ for magnesium substitution at different molar ratios. Cements were prepared by reacting the ceramic powder with primary acidic calcium phosphate in the presence of water. The bone regeneration efficacy of the new biomaterials was tested by creating critical defects in the calvaria of adult male New Zealand rabbits. The percentage of newly formed bone (NB%) and remnant biomaterial were evaluated at 8 and 12 weeks after implantation.

Results and discussion

All animals recruited for the study survived the surgeries and the recovery was uneventful.

- A. Macroscopic evaluation: All cements were well incorporated to the adjacent bone and did not elicit an obvious inflammatory reaction. Residual cement granules could be appreciated after 8 weeks of surgery.
- B. Histological evaluation: Magnesium ions indeed improve the bone formation experienced with undoped cements whereas silicon ions improve the new bone formation but it seems to be less efficient than magnesium ions although the statistic difference was insignificant. Furthermore, Mg-doped cements improve the degradability of the scaffold. Another interesting observation is the increase in stability of Si-cements indicated by increase of the residual bone graft.
- C. Generally, lower concentration of ions in the cement resulted in higher new bone formation.

These differences could be explained by the changes in structure of the bone substitutes. In vitro experiments showed the formation of apatite-like layer on the surface of 80%Si cements and thus increasing the in vivo stability of the bone substitute.

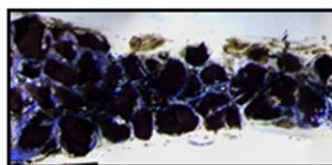


Fig1. Histological section of bone defect filled with 80%Si-cement

Clinically, the selection of adequate bone graft depends on the stability of the bone graft. The filling of post-extraction socket require degradable bone substitute whereas the sinus floor augmentation and inadequate alveolar ridge width require more stable bone graft.

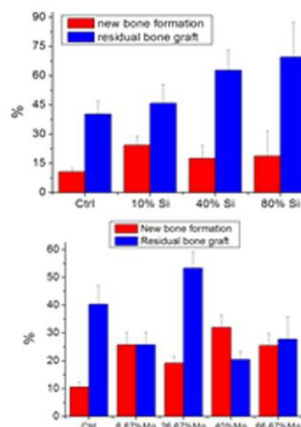


Fig2. Effect of ionic substitution of brushite cements on the in vivo behaviour of the biomaterials

Conclusion

Ionic substitution may adequate bone graft to the clinical application and thus increase the predictability of bone regeneration procedures.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MAT2010-15349).

2011:

Julia Lucas-Aparicio, Mohammad H Alkhraisat, Carmen Rueda, Marco Laurenti, U. Gbureck, A Ewald, Luis Blanco, Enrique López-Cabarcos. *A Novel Calcium Phosphate-Calcium silicate composite: biological performace*. Póster. Cost Action D43 meeting Functionalized Materials and Interfaces, UCM-Faculty of Pharmacy, Madrid, Spain. March 30th –April 1st, 2011.

A NOVEL CALCIUM PHOSPHATE-CALCIUM SILICATE COMPOSITE: BIOLOGICAL PERFORMANCE

J. Lucas-Aparicio¹, MH Alkhraisat², C. Rueda², M. Laurenti², U. Gbureck³, A. Ewald³, L. Blanco¹ and E López-Cabarcos²

¹: Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain, julia-aparicio@farm.ucm.es.

²: Departamento de Química Física II Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain.

³: Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Germany.



INTRODUCTION

Silicon was an essential trace element for metabolic processes associated with the development of bone and connective tissues. Bio-inspired silicon substitution in calcium phosphates enhances implant-tissue interaction as well as *in vivo* implant degradation favoring their bone regeneration [1].

MATERIALS AND METHODS

•Calcium phosphate-calcium silicate composite:

β-tricalcium phosphate (β-TCP) was obtained with calcium carbonate and dicalcium phosphate dehydrated (DCPD) at 1100 °C for 14h. The Si-doped ceramic was prepared by substituting DCPD with SiO₂ at different molar ratios keeping the [Ca]/[P+Si]] ratio constant at 1.5. The calcium phosphate cements (CPC) was obtained by mixing the Si-β-TCP with monocalcium phosphate monohydrated and reacted with 1M citric acid at a powder to liquid ratio of 1.5 and 2 g.ml⁻¹(Fig. 1). Cement samples were produced using rubber silicon moulds (Fig. 2). X-ray diffraction patterns were recorded on Philips X pert diffractometer.

•Citocompatibility test with human osteoblast cell line:

Cement samples were prepared with β-TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP and 80% Si-TCP. The cements were washed, sterilized and placed in triplicate into a 24-well plate (Fig. 3), human osteoblasts like cell line MG 63 were seeded onto CPCs with an initial density of 50.000 per ml. Cell proliferation and viability were determinate after 3, 5, 7, and 10 days culture. Cell viability was analyzed by using cell proliferation reagent WST 1 and quantified in a Tecan spectra fluor plus photometer. Cell proliferation was measured by electronic cell counting using a CASY 1 TTC cell analyzer. The results were analyzed with two-way analysis of variance ANOVA and Tukey test (P<0.05).

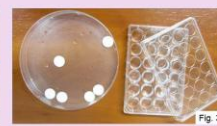
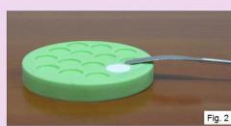


Fig. 1, 2 and 3:
Images from different parts
of the realization of CPC
samples.

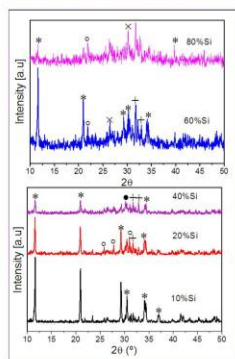


Fig. 4:
X-ray diffraction patterns of CPCs prepared with TCP of Si content ranged between 10-80%. Prominent peaks were labelled for brushite (*), unreacted β-TCP (°), HA (+), silicocarnotite (*) and monetite (x).

RESULTS

The analysis of X-ray diffraction patterns of Si-doped CPCs was characterized by the presence of crystalline elements (brushite and hydroxylapatite), C-S-H (2θ=29.8°), especially at high Si content, and amorphous phases (Fig. 4).

The activity and proliferation of osteoblast was significantly enhanced by Si-substituted cement (Fig. 5). WST test showed that cellular activity was significantly affected by CPC type. This activity was linearly and significantly enhanced to more than 2 folds for osteoblast cells grow on CPC prepared with 80% Si-TCP when compared to cells seeded on un-substituted cement. Cell proliferation is similar on CPCs prepared with 20%, 40% Si-TCPs, and undoped β-TCP, whereas the CPC prepared with 80% Si-TCP enhanced cell proliferation to more than 3 folds when compared to brushite cements.

DISCUSSION

A possible inclusion of Si₄⁺ ions into brushite crystals is suggested by the diffraction peaks shift toward lower angles and the increase of diffraction peaks. The release of Si₄⁺ ions, mainly, from Si-substituted cements, as Ca²⁺ and P_a³⁻ ions can improve in cell proliferation and activity.

An optimum *in vitro* and *in vivo* effect of Si may be laid in providing adequate Si concentration that affects bone metabolism thought an equilibrated effect on the mechanism that control the cellular activity of bone-forming and bone-reabsorption cells [1].

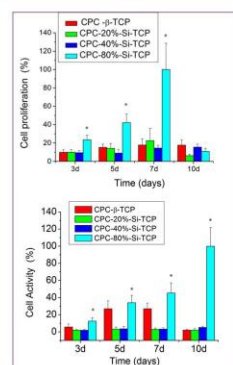


Fig. 5:
MG 63 cell proliferation and activity after seeding on CPCs prepared with β-TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP.

CONCLUSIONS

A novel cement system was developed to produce a composite of brushite and calcium silicate hydrate (C-S-H). The silicon ions released from Si-doped cements resulted in significant enhancement of osteoblast activity and proliferation. Thus, we conclude that this new cement system could be a promising material in bone engineering.

REFERENCES

1. Alkhraisat MH et al. Acta Biomaterialia 2010, 6:257-265.

Julia Lucas-Aparicio, Mohammad Alkhraisat, Jatsue Cabrejos-Azama, Carmen Rueda, Jesus Torres, Uwe Gbureck, Andrea Ewald, Luis Blanco-Jerez, Enrique Lopez-Cabarcos. *Gradient Biomaterials for Bone tissue regeneration: the combination of calcium phosphate and calcium silicate.* Póster: 325. Topic: Tissue augmentation and engineering. 20th European Association for osseointegration, Atenas, 12-15 October, 2011.

Gradient Biomaterials for Bone tissue regeneration: the combination of calcium phosphate and calcium silicate

Poster Number

Julia Lucas-Aparicio^{1,2}, Mohammad Alkhraisat¹, Jatsue Cabrejos-Azama^{1,2}, Carmen Rueda¹, Jesus Torres¹, Uwe Gbureck³, Andrea Ewald³, Luis Blanco-Jerez², Enrique Lopez-Cabarcos¹

¹ Departamento de Química-Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain
² Departamento de Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain
³ Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany
⁴ Departamento de Ciencias de la Salud II, Facultad de Ciencias de la Salud, URJC, Alcorcón-Madrid, Spain

Abstract

The development of biomaterials with gradient properties will be the threshold towards the regeneration of tissues and also for the development of soft-hard tissue interfaces. We believe the combination in a cement system of a calcium phosphate and a calcium silicate will generate biomaterials that vary in their physico-chemical and biological properties. Clinically, the synthesis of these biomaterials could have an evolutionary outcomes in periodontal and in craniofacial tissue regeneration. Herein, we report a cement that employs silicon-containing ceramics to develop bioceramics with scaling up properties [1].

Background and Aim

The variation of silicon content in bioceramics will result in bioceramics with controllable properties and improved *in vivo* performance.

Methods and Materials

Calcium phosphate-calcium silicate composite:
 β -tricalcium phosphate (β -TCP) was obtained by heating calcium carbonate and dicalcium phosphate dehydrated (DCPD) at 1100 °C for 14h. The Si-doped ceramic (Si- β -TCP) was prepared by substituting DCPD with SiO₂ at different molar ratios keeping the [Ca]/[P+Si] ratio constant at 1.5 during the process.
 The calcium phosphate cement (CPC) was obtained by mixing the Si- β -TCP with monocalcium phosphate monohydrated and reacted with 1M citric acid at a powder to liquid ratio of 1.5 to 2.5 g.mL⁻¹. Cement samples were produced using rubber silicon moulds (Fig. 1 and 2).

Material properties:
 The final setting time of the CPC was measured using Vicat needle test (1 mm & 400 g).
 Cement cylinders were aged in H₂O at 37 °C for 24 h prior to testing and subsequently diametral tensile strength was measured.

Pharmaceutical characterization:
 Si-CPC were tested as vehicle for local drug delivery using vancomycin as model drug. Si-CPC were loaded with vancomycin by incubating cement cylinders at drug concentration of 5 mg/mL for 24 hours at 37 °C in a thermostatic bath under constant stirring (90 rpm). After 24 hours samples were incubated in 8 mL PBS (pH 7.4 and 37°C) renewing the medium every 30 min. The concentration of vancomycin released was followed by UV-VIS spectroscopy (absorbance at 280 nm).

Citocompatibility test with human osteoblast cell line:
 Cement samples were prepared with β -TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP and 80% Si-TCP. The cements were washed, sterilized and placed in triplicate into a 24-well plate. Human osteoblasts like cell line MG 63 were seeded onto CPCs with an initial density of 50,000 per mL.
 Cell proliferation and viability were determined after 3, 5, 7, and 10 days culture. Cell viability was analyzed by using cell proliferation reagent WST-1 and quantified in a Tecan spectra fluor plus photometer. Cell proliferation was measured by electronic cell counting using a CASY 1 TTC cell analyzer. The results were analyzed with two-way analysis of variance ANOVA and Tukey test (p<0.05).

In Vivo

Four healthy 6-month-old female New Zealand rabbits were used. They were anaesthetized with an intramuscular dose of the ketamine and xilazine. Two circular holes were made in the parietal bone on each side of the median sagittal suture using a trephine on a slow-speed electric hand piece. The tested materials were stabilized inside the bone defects and covered with a collagen membrane before the wound was sutured.
 The animals were sacrificed 8 weeks after the intervention with an overdose of sodium pentobarbital IV (Fig. 3-6).



Fig. 3: Photograph of the trephine. Fig. 4, 5 and 6: photograph of rabbit calvaria with two critical defects where the tested materials were stabilized.

Post-mortem, the samples were harvest and preserved fixed in a formaldehyde 10% buffer solution at pH 7 (Fig. 7-9). Bone samples were dehydrated in ascending series of alcohol (60-100%) embedded in 2-hydroxy-ethyl-methacrylated, and subsequently photopolymerized with white and UV light into sample blocks. A saw microtome was used to cut coronal sections 200µm thick which were then ground to 50-80 µm. Surface staining was performed with toluidine blue. The histological evaluation of bone neoformation was carried out by means of optical microscopy (Figs. 10-13).




Fig. 7, 8 and 9: the bone blocks containing the cement with 10% Si-TCP, 40% Si-TCP and 80% Si-TCP from the animal's calvarias was harvested.



Fig. 10, 11, 12 and 13: optical microscopy image of CPC with β -TCP (Fig. 10), % Si-TCP (Fig. 11), 40% Si-TCP (Fig. 12) and 80% Si-TCP (Fig. 13).

Results

The developed materials grade in their setting and mechanical properties such that shorter setting time and lower tensile strength are associated with higher silicon content and the increase of liquid phases to retard the setting reaction (Table 1).

CPC	Setting Time	DTS (MPa)	P/L (g.mL ⁻¹)
β -TCP	25'	1.9 ± 0.2	2.5
20% Si	1' 40"	1.3 ± 0.2	2.5
40% Si	2' 30"	2.5 ± 0.4	2
80% Si	3' 30"	0.7 ± 0.1	1.5

Table 1

Similarly, the kinetic of antibiotic release is switched from rapid release with an initial burst to zero-order release kinetic that slowed down at later time points. This profile was shifted to almost linear profile at constant velocity for CPC prepared with 80% Si-TCP (Fig. 14).



Fig. 14: Drug released from CPCs prepared with β -TCP, 40% Si-TCP and 80% Si-TCP.

Interestingly, osteoblasts grown on cement surfaces showed higher proliferation and activity at higher silicon content. The activity was linearly and significantly enhanced to more than 2 folds for osteoblast cells growth on CPC prepared with 80% Si-TCP when compared to cells seeded on unsubstituted cement. The CPC prepared with 80% Si-TCP enhanced cell proliferation to more than 3 folds when compared to brushite cements. (Fig. 15).



Fig. 15: MG 63 cell proliferation and activity after seeding on CPCs prepared with β -TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP y 80% Si-TCP.

The *in vivo* results of CPCs prepared with 10 and 40% Si showed that the bone substitutes interact efficiently with the surrounding bone and induce the formation of more bone tissue. Furthermore, these cements present slower degradation rates. These properties scale up with the increase in silicon content (Fig. 16).



Fig. 16: Percentage of newly bone formed and remain graft for β -TCP, 10% Si-TCP, 40% Si-TCP and 80% Si-TCP.


Conclusions

The ultimate goal of both researchers and clinicians is to provide efficient techniques to restore function and aesthetics to damages tissue. However, such task is complicated in dentistry due to the necessity of regeneration of the periodontium (soft-hard interface).
 We think that the development of biomaterials with gradient properties is a must in periodontal regeneration. Silicon substitution opens a way to develop such biomaterials which addition could have a positive influence on both soft and hard tissue due to the release of silicon.

References

1. Alkhraisat MH et al. *Acta Biomaterialia* 2010, 6:257-265.


Presented at the 20th Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration
 3-15 October 2011, Athens, Greece



EUROPEAN ASSOCIATION FOR OSSEOINTEGRATION

2010:

M. Alkhraisat, J.L. Aparicio, C. Rueda, A. Ewald, L.J. Blanco, U. Gbureck, E. Cabarcos. *A Novel Calcium Phosphate-Calcium Silicate Composite*. 23rd European Conference on Biomaterials. Tampere, Finland, September 11-15, 2010.




A novel Calcium Phosphate-Calcium Silicate Composite

M. Alkhraisat,¹ J.L. Aparicio,^{1,2} C. Rueda,¹ A. Ewald,³ L. J. Blanco,² U. Gbureck,³ E. L. Cabarcos¹

Email: mkhresat@farm.ucm.es

¹ Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain.
² Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain.
³ Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany.



Introduction

Increasing evidences support the good biological performance of Si substituted calcium phosphate ceramics [1]. However, lesser attention is given to the use of Si doping to enhance the bioactivity of brushite cements. We have recently shown that the cement modification with silica gel enhances the cohesion and increases the residual graft after 8 weeks of implantation in vivo [2]. For that, a novel doping system was developed to produce a cement composite of brushite and calcium silicate hydrate (C-S-H).

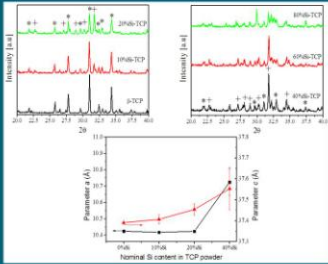


Fig. 1. X-ray diffraction and Rietveld analysis of Si-doped ceramics. Prominent peaks were labelled for β-TCP (*) and silicocarnotite

Materials and Methods

Si-doped ceramic was prepared by substituting brushite with SiO₂ at different molar ratios, the [Ca/(P+Si)] ratio was constant at 1.5. Si-doped ceramics with a general formula Ca₅(PO₄)_{3-x}(SiO₄)_x were then reacted with primary monocalcium phosphate (MCPM, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O) and 1M citric acid for cement production. Structural characterization was performed by X-ray diffraction and Scanning electron microscopy (SEM). Cements were also characterized by measuring the setting time, diametral tensile strength, porosity and specific surface area (SSA).

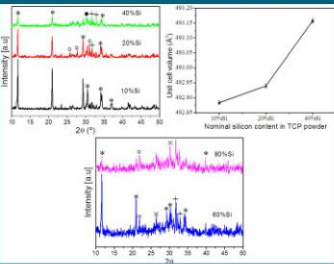


Fig. 2. X-ray diffraction and Rietveld analysis of Si-doped cements. Prominent peaks were labelled for brushite (*), unreacted β-TCP (°), HA (+), silicocarnotite (•) and monetite (x)

Results

Si-doped ceramics (Fig. 1) are mainly composed of β-TCP and silicocarnotite (Ca₅(PO₄)_{3-x}(SiO₄)_x). The diffraction peaks of β-TCP are shifted toward lower diffraction angles and Rietveld refinement analysis showed that the unit cell parameter c increases with the increasing Si content.

The X-ray diffraction patterns of Si-doped cements are characterized by the presence of crystalline and amorphous phases (Fig. 2). The appearance of a hump centred at about 2θ of 30° is noticeable for cements prepared at Si content ≥ 20%. This could be indicative of the presence of C-S-H gel which is known to show a hump centred at 2θ=29.8° [3]. Brushite peaks were also identified for cements prepared at all Si contents. However, the intensity of Brushite peaks decreases and are shifted toward lower angles with increasing Si content. Hydroxylapatite (HA), unreacted β-TCP, and silicocarnotite were also identified. The Rietveld analysis has shown that the unit cell volume of brushite increases with the increase in Si content.

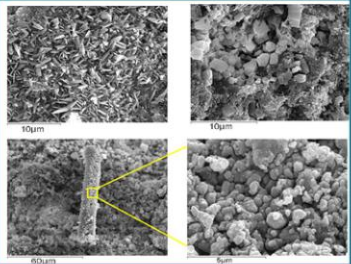


Fig. 3 SEM images for fractural surface of CPCs prepared with 20%Si-TCP (upper) and 80%Si-TCP (lower).

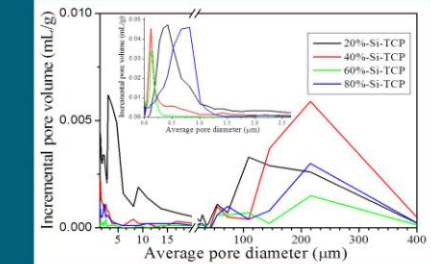


Fig. 4. Pore diameter distribution of CPCs prepared with TCP of Si content ranged between 20-80%.

CPC prepared	Cement setting Properties		Hg-Porosity (%)	Average pore diameter (μm)
	DTS (MPa)	FST (minute)		
β-TCP	1.9 ± 0.2	20 ± 1	37	0.135
20%Si-TCP	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	41	1.725
40%Si-TCP	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.2	43	0.048
60%Si-TCP	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1	39	0.041
80%Si-TCP	0.7 ± 0.1	3.0 ± 0.5	41	0.037

Table 1. Diametral tensile strength (DTS), final setting time (FST), porosity and average pore diameter of Si-doped CPCs.

Discussion

Si-doped ceramics were successful to produce a cement composite of brushite and C-S-H. The catalysing effect of Si doping on cement setting reaction is manifested by the shortening of the cement FST [2]. However, a major increase in cement SSA and a nanometric average pore diameter were achieved by the increase in Si content. This effect could be related to the reduction of crystals size and also to the precipitation of HA and C-S-H that are known to have higher SSA than brushite crystals [4, 5].

Conclusions

A novel cement system was developed to produce a composite of brushite and C-S-H. The new biomaterial is characterized by a high surface area and nanometric pores.

References

- Hing KA, et al. Biomaterials 2006;27:5014.
- Alkhraisat MH et al. Acta Biomater 2010;6:257.
- Houston JR, et al. Geochem Trans 2009;10:1.
- Damen JJM, et al. J Dent Res 1989;68:1355.
- Gbureck U, et al. J Control Release 2007;122:173-180.

A novel Calcium Phosphate-Calcium Silicate Composite

M. Alkhraisat,¹ J.L. Aparicio,^{1,2} A. Ewald,³ C. Rueda,¹ L. J. Blanco,² Gbureck U,³ E. L. Cabarcos¹

Email: malkhresat@farm.ucm.es

¹ Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain.

² Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain.

³ Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

Introduction

Increasing evidences support the good biological performance of Si substituted calcium phosphate ceramics [1]. However, lesser attention is given to use Si doping to enhance the bioactivity of brushite cements. We have recently shown that the cement modification with silica gel enhances the cohesion and increases the residual graft after 8 weeks of implantation in vivo [2]. For that, a novel doping system was developed to produce a cement composite of brushite and calcium silicate hydrate (C-S-H).

Materials and Methods

Si-doped ceramic was prepared by substituting brushite with SiO₂ at different molar ratios, the [Ca/(P+Si)] ratio was constant at 1.5 by increasing CaCO₃ amount. Si-doped ceramics with a general formula Ca₃(PO₄)_{1-x}(SiO₄)_x were then reacted with primary monocalcium phosphate (MCPM, Ca(H₂PO₄)₂) and 1M citric acid for cement production. Structural characterization was performed by X-ray diffraction and Scanning electron microscopy (SEM). Cements were also characterized by measuring the setting time, diametral tensile strength, porosity and specific surface area (SSA).

Results

Si-doped ceramics (Fig. 1) are mainly composed of β -TCP and silicocarnotite (Ca₃(PO₄)₂SiO₄). The diffraction peaks of β -TCP shift toward lower diffraction angles and Rietveld refinement analysis showed that the unit cell parameter *c* increases with the increasing Si content whereas the parameter *a* was not significantly affected.

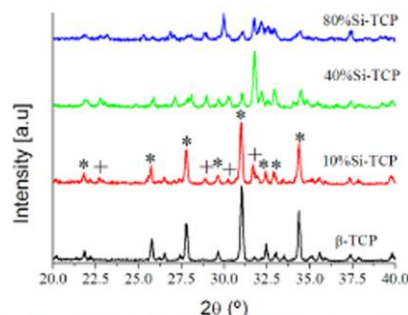


Fig. 1. X-ray diffraction patterns of Si-doped ceramics. Prominent peaks were labelled for β -TCP (*) and silicocarnotite (+).

The X-ray diffraction patterns of Si-doped cements are characterized by the presence of crystalline and amorphous phases (see Fig. 2). The appearance of a hump that is centred at about 2θ of 30° is noticeable for cements prepared at Si content $\geq 20\%$. This could be indicative of the presence of C-S-H which is known to

show a hump centred at $2\theta=29.8^\circ$ [3]. Brushite peaks were also identified for cements prepared at all Si contents. However, the intensity of Brushite peaks decreases and shifts to lower angles with an increase in Si content. Hydroxylapatite (HA), unreacted β -TCP, and silicocarnotite were also identified. The Rietveld analysis has shown that the unit cell volume of brushite increases with the increase in Si content.

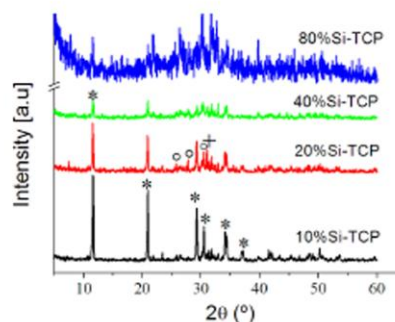


Fig. 2. X-ray diffraction patterns of Si-doped cements. Prominent peaks were labelled for brushite (*), unreacted β -TCP (o), and HA (+).

The cement final setting time (FST) and wet diametral tensile strength (DTS) decreased with increasing Si content. Furthermore, Si doping caused a shift of the average pore diameter to the nanometric range. Interestingly, the incorporation of Si has a pronounced effect on CPCs specific surface area that reaches a value of approx. 16 and 29 m².g⁻¹ for cements prepared with 40% and 80% Si-TCP, respectively.

Discussion

The use of Si-doped ceramics was successful to produce a cement composite of brushite and C-S-H. The increase in Si content was shown to decrease the FST and DTS. This is possibly related to the decrease in PLR, shorter FST and the shift of crystals morphology to rounded morphology impeding crystals [4]. However, a major increase in cement SSA and a nanometric average pore diameter were achieved by the increase in Si content.

Conclusions

A novel cement system was developed to produce a composite of brushite and C-S-H. This novel cement could be promising for bone engineering and as a matrix for drug local delivery.

References

1. Hing KA, et al. *Biomaterials* 2006;27:5014.
2. Alkhraisat MH et al. *Acta Biomater* 2010;6:257.
3. Houston JR, et al. *Geochem Trans* 2009;10:1.
4. Bohner M, et al. *Biomaterials* 2005;26:6423.

M. Alkhraisat, **J.L. Aparicio**, A Ewald, C. Rueda, L.J. Blanco, U. Gbureck, E. Cabarcos. *Silicon release and osteoblast response to a novel calcium phosphate-calcium silicate composite*. 23rd European Conference on Biomaterials. Tampere, Finland, September 11-15, 2010.

Silicon release and osteoblast response to a novel calcium phosphate-calcium silicate composite

M. Alkhraisat,¹ J.L. Aparicio,^{1,2} A. Ewald,³ C. Rueda,¹ L. J. Blanco,² Gbureck U,³ E. L. Cabarcos¹

Email: mkhresat@farm.ucm.es

¹ Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain.

² Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain.

³ Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

Introduction

Silicon (Si) was advocated as an essential trace element for metabolic processes associated with the development of bone and connective tissues [1]. Si substitution was employed to enhance the bioactivity of calcium phosphates. Herein, we are reporting about the effect of Si doping on the ions release and cytocompatibility of a brushite cement system.

Materials and Methods

Cement samples were prepared from Si-doped ceramic. These ceramics were synthesised by substituting brushite with SiO₂ at molar ratios of 20%, 40% and 80%, the [Ca/(P+Si)] ratio was constant at 1.5 by increasing CaCO₃ amount. Ions release and pH was monitored by cement incubation in distilled water during 7 days. New cement samples were thoroughly washed and sterilized after preparation. Samples were seeded with osteoblast-like cells MG 63 for 3, 5, 7 and 10 days. Cell activity and proliferation was observed and data were statistically analyzed.

Results

Cements prepared with 40% Si-TCP release Si constantly at about 10.4 ppm during the first 2 days. This rate was lineally increased to about 33 ppm and maintained constant after the 4th day of incubation (Figure 1). Similarly, cements prepared with 80% Si-TCP release Si at about 10 ppm during the first 2 days of incubation. This release was increased and maintained constant at about 41 ppm on the fifth day of incubation (Figure 1). The calcium and phosphate release was the highest for undoped brushite cement.

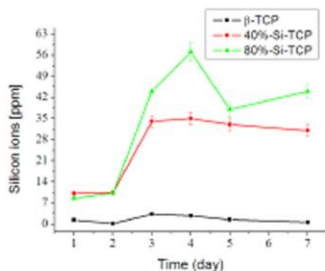


Fig. 1. Si release from cements prepared with β-TCP, 40%Si-TCP, and 80%Si-TCP.

The changes in the pH of the incubation medium reveals the acidity of brushite cements. After 24h, the pH was approx. 3.7 and thence after was increasing toward a pH of 6 (Figure 2). Interestingly, these changes in pH were converging from a pH of 7.8 after 24h of incubation to a pH of 7 for the CPC prepared with 40% Si-TCP and 80% Si-TCP (Figure 2). Furthermore, cell proliferation was continuously increased till the seventh day of culture and characterized by the absence of significant differences

between unsubstituted cement and cements prepared with 20% and 40% Si-TCP (Figure 3). However, CPC prepared with 80% Si-TCP significantly enhanced cell proliferation to more than 3 folds when compared to unsubstituted brushite cements (Figure 3). Similar results were observed when cellular activity was analyzed.

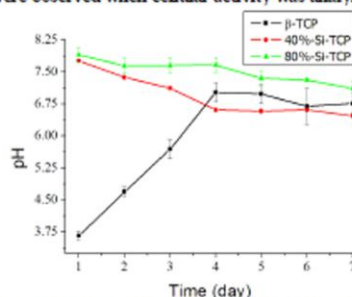


Fig. 2. Changes in the pH of distilled water during the ageing of CPCs prepared with β-TCP, 40%Si-TCP and 80%Si-TCP.

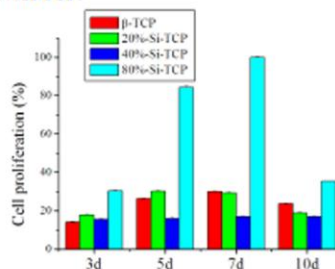


Fig. 3. MG 63 cell proliferation on CPCs prepared with β-TCP, 20% Si-TCP, 40% Si-TCP and 80% Si-TCP.

Discussion

Si doping in this cement system resulted in a composite of brushite and calcium silicate hydrate (C-S-H). The improvement in cell proliferation and activity could be related to the release of Si from Si-doped cements. The increase in osteoblast proliferation and activity could be mediated by the up-regulation of growth factors and genes that is necessary for these cellular processes [2,3].

Conclusions

Structural changes in cement matrix as well as Si release offer a promising approach to enhance osteoblasts activity and proliferation. Thus, Si doping could be valuable to increase the efficiency of resorbable bone substitutes.

References

1. Carlisle E. Nutr Rev 1982;40:193-198.
2. Sun J, et al. Acta Biomater 2009;5:1284.
3. Keeting P, et al. J Biomed Mater Res 1992;7:1281.

J.L. Aparicio, M. Alkhraisat, C. Rueda, L. Blanco, U. Gbureck, E. Cabarcos. *A Potential Switch to Modulate Drug Release from Cement Systems: The Case of Vancomycin.* 23rd European Conference on Biomaterials. Tampere, Finland, September 11-15, 2010.

A Potential Switch to Modulate Drug Release from Cement Systems: the Case of Vancomycin

J.L. Aparicio,^{1,2} M. Alkhraisat,¹ C. Rueda,¹ L. J. Blanco,² Gbureck U,³ E. L. Cabarcos¹

Email: cabarcos@farm.ucm.es

¹ Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Spain.

² Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Spain.

³ Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany.

Introduction

The efficient use of cements in controlled-drug delivery systems demands an improved capability of drug adsorption and modulable release profile according to therapeutic needs. Herein, we are demonstrating that Si doping in brushite cement systems significantly enhanced drug adsorption and provided an efficient tool to control drug release profile.

Materials and Methods

Si-doped ceramic of general formula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_2)_x$ was prepared by substituting brushite with SiO_2 at molar ratios of 40% and 80%, the $[\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})]$ ratio was constant at 1.5 by increasing CaCO_3 amount during synthesis. Vancomycin adsorption was studied by incubating cement cylinders at drug concentration of 5, 10 and 20 mg/ml for 24h. Thereafter, the cements were decomposed in 2.5 M HCl and UV-absorbance was measured. Loaded samples were incubated in phosphate buffer solution and drug release was monitored using UV-VIS spectroscopy.

Results

Fig. 1 shows that the amount of adsorbed antibiotic was increased by the increase in antibiotic concentration in the incubation medium. Si doping was highly efficient to improve cement's drug uptake as cement prepared of 80%Si-TCP was four folds more efficient than undoped cements when incubated in 20 mg/ml of vancomycin.

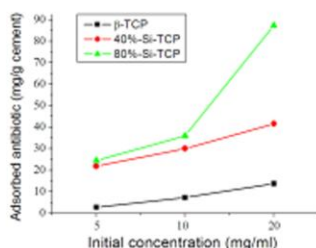


Fig. 1. Vancomycin adsorption to cements prepared with β -TCP, 40%Si-TCP and 80%Si-TCP.

The vancomycin release from cement samples was sensitive to Si doping. Un-substituted brushite cements released almost 60% of the loaded dose after ~ 13 h and 80% of the loaded dose after 157 h. The cement preparation with 40%Si-TCP lowered the release rate and release was only 41% of the total loaded dose after 157 h. Interestingly, the release profile was almost linear for cement prepared with 80%Si-TCP resulting in the release of 27% of the total dose after 157 h at a rate of $0.14 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. The cements incubation in $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ antibiotic solution increased the rate of vancomycin desorption and increased the total released

amount to 93%, 62% and 53% after 157 h for cements prepared with β -TCP, 40%Si-TCP and 80%Si-TCP (Fig. 3).

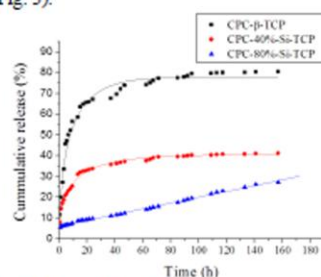


Fig. 2. Drug release from cements prepared with β -TCP, 40%Si-TCP and 80%Si-TCP after being aged at drug concentrations of $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Vancomycin release from samples incubated at vancomycin concentration of $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ followed Fickian diffusion mechanism as the exponent n was < 0.45 [1], whereas an anomalous transport mechanism could be concluded ($0.45 < n < 0.89$) for samples prepared with 80%Si-TCP.

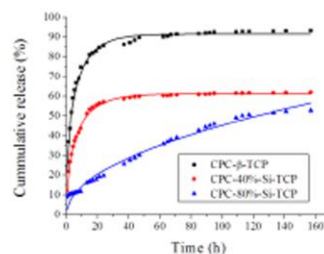


Fig. 3. Drug release from cements prepared with β -TCP, 40%Si-TCP and 80%Si-TCP after being aged at drug concentrations of $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Discussion

Si-doping initiates several structural changes that could mediate the enhancement of drug uptake. These changes include the formation brushite and C-S-H composite of high surface area ($29 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). The pore size distribution of Si-doped cements indicates a higher tortuosity of the cement matrix that is manifested in a slower releasing rate [1].

Conclusions

Si doping is showed to be an efficient tool to enhance drug uptake as well as the control of drug release profile.

References

1. Gbureck U, et al. J Control Release 2007;122:173.

2009:

MH. Alkhraisat, CR Rueda, J Cabrejos, **JL Aparicio**, FM Tamimi, LB Jerez, U Gbureck, E Lopez-Cabarcos. *Doxycycline release from a novel cement system*. Poster; 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, Switzerland. 08-12th September, 2009.

Doxycycline Release from a Novel Cement System

MH. Alkhraisat, CR Rueda, J Cabrejos, JL Aparicio, FM Tamimi, LB Jerez, U Gbureck, E López-Cabarcos.
DDS, MSc, PhD. Email: mkhresat@farm.ucm.es
Dpto. Química-Física II, Facultad Farmacia, UCM, 28040 Madrid, Spain.

Introduction

Ionic substitution has been proved to be an elegant method to modify properties of calcium phosphate ceramics [1]. Herein, we investigated doxycycline hyclate release from a novel strontium-substituted secondary calcium phosphate cement [2].

Materials and Methods

Sr-substituted β -TCs ($\text{Ca}_{3-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_2$; $0 < x < 1.5$) were prepared by solid state reaction and reacted with primary monocalcium phosphate (MCPM, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) for cement production. Cement cylinders (392.5 mm^3) with an aspect ratio of 2 were incubated in doxycycline solution (5-24 g/ml) for 24h. The total cement load was measured after cement dissolving in 2.5M HCL. Drug desorption were carried on by loaded cylinder incubation in phosphate buffer solution (pH=7.4) at 37°C. The incubation medium was renewed and drug concentration was determined with UV-VIS spectroscopy operating at 351 nm.

Results

Doxycycline hyclate adsorption was increased almost linearly up to 10 mg/ml reaching a saturation at higher concentrations (Figure 1). Sr-containing cements were more efficient in antibiotic uptake from the solution compared with Sr-free cements.

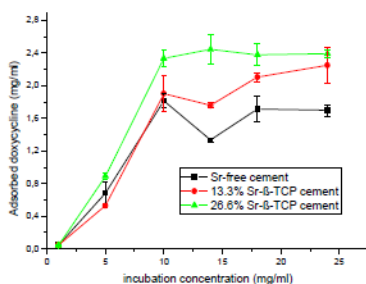


Figure 1. Effect of incubation concentration on doxycycline hyclate adsorption to cement surfaces.

At equilibrium state, the experimental data fit well with BET isotherm (Figure 2) indicating that the adsorption is influenced by both physical and chemical interactions. Doxycycline molecules could bind to cement surfaces through calcium carboxylate complexations. Desorption of doxycycline from cement cylinders consisted of a fast initial burst followed by slower release rate and was significantly slower for Sr-containing cements (Figure 3). Quantitative release > 99% of the adsorbed antibiotic was observed after 872 and 1591 minutes of incubation for CPC prepared with β -TCP, 13.3% Sr- β -TCP and 26.7% Sr- β -TCP, respectively.

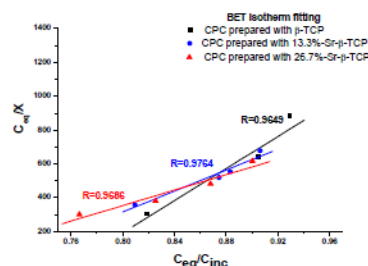


Figure 2. BET isotherm fitting to doxycycline adsorption on CPC.

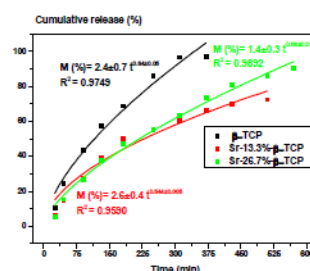


Figure 3. Doxycycline desorption from CPC.

Release data were modelled with the Korsmeyer-Peppas law ($M(t) = kt^n$) to identify the release mechanism, where M is the cumulative release, k is a constant incorporating structural and geometric characteristics of the matrix, and n is the release exponent. Fitting of the experimental data have resulted in n values of 0.64, 0.54 and 0.66 for CPC cements prepared with β -TCP, 13.3%Sr- β -TCP and 26.7%Sr- β -TCP, respectively. These values indicate anomalous transport as the responsible mechanism for doxycycline release from cement surfaces.

Discussion and Conclusions

Strontium modified cements are more efficient in doxycycline uptake. This could be attributed to the increase in the mean pore size of the cement matrix. Drug desorption was found to be slower from strontium modified cements, which is likely a result of different complex stability between Sr^{2+} and Ca^{2+} ions with doxycycline molecule.

References

1. Bigi A, Foresti E, Gregorini R, et al. *Calcif Tissue Int* 1992;50:439-44.
2. Alkhraisat MH, Moseke C, Blanco L, et al. *Biomaterials* 2008;29:4691-4697

